

Aus der  
Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Mayatepek

**Interaktion von Bakterien und humanen Endothelzellen im Rahmen  
der bakteriellen Endokarditis  
- Zellbesiedlung auf Fibrin- und Kollagen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Carolin Pelzer  
2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Schrotten  
Korreferent: Prof. Dr. MacKenzie

Meiner Familie

## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heying, R., Wolf, C., Beekhuizen, H., Moelleken, M.-L., Jockenhoevel, S., Hoylaerts, M. F., Schmidt, K. G., Schroten, H.; 2012; Fibrin – and Collagen-Based Matrices Attenuate Inflammatory and Procoagulant Responses in Human Endothelial Cell Cultures Exposed to *Staphylococcus aureus*  
TISSUE ENGINEERING : Part A (Volume 18, Numbers 1 and 2), S. 147-156

## Zusammenfassung

Die bakterielle Endokarditis ist bis heute eine ernstzunehmende, lebensbedrohliche Erkrankung. Insbesondere nach operativem Herzklappenersatz ist die infektiöse Endokarditis (IE) als Komplikation von herausragender Bedeutung. Als Erreger spielen vor allem *Staphylococcus aureus* sowie *Streptococcus sanguis* und *Staphylococcus epidermidis* eine Rolle. Nach bakterieller Adhäsion kommt es im Rahmen der IE zur Interaktion der Bakterien mit Endothelzellen und Monozyten, die zur proinflammatorischen und prokoagulanten Aktivierung der infizierten Endothelzellen führt. Hierdurch kommt es zur Ausbildung von Klappenvegetationen und nicht selten zur Destruktion der Klappe und weiteren Komplikationen wie (septischen) Thromboembolien. Um die Biokompatibilität von Herzklappentransplantaten zu steigern, ist die Erschaffung der optimalen Herzklappe aus autologem Zellmaterial im Rahmen des Tissue Engineering Ziel aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen. Das „optimale Herzklappentransplantat“ vereint gute operative Bedingungen, keine Immunreaktion und minimales Risiko für Infektion, Kalzifizierung und Degeneration sowie Thrombenbildung.

In dieser Arbeit soll der Einfluss der Matrix, auf der die Zellen im Rahmen des Tissue Engineering kultiviert werden, auf die Ausprägung der proinflammatorischen und prokoagulanten Reaktion nach bakterieller Infektion untersucht werden. Wir kultivierten humane Endothelzellen auf Fibringel und Kollagengel sowie als Kontrolle auf Polysteren und infizierten diese mit *S. aureus*, *S. sanguis* und *S. epidermidis*.

Insbesondere *S. aureus* führte auf den Gelmatrices zu einer erhöhten Infektionsrate (4,2% der Infektionsdosis auf Fibringel, 3,7% auf Kollagengel und 1,2% auf Polysteren,  $p < 0,01$ ) sowie zu einer erhöhten Adhäsion von Monozyten (61% auf Fibringel,  $p < 0,01$  und 43% auf Kollagengel,  $p < 0,05$ , 30% auf Polysteren). Die Expression der Oberflächenmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) zeigten auf allen Matrices vergleichbare Werte, ebenso die Produktion proinflammatorischer Zytokine.

Die Messung der Tissue Faktor-abhängigen Produktion von Gerinnungsfaktor FXa in Abwesenheit der Monozyten zeigt einen mäßigen Anstieg, wohingegen es in Anwesenheit der Monozyten auf Polysteren zu einer ausgeprägten Steigerung der TF-abhängigen Gerinnung kommt.

Im Gegensatz dazu ist der gerinnungsaktivierende Effekt der adhärenen Monozyten nicht aufzuweisen, wenn die ECs auf den beiden Gelmatrices kultiviert sind. Dies führt zu der interessanten Folgerung, dass die Gelmatrices trotz einer erhöhten Anzahl adhärenen Monozyten die Tissue Faktor (TF) -abhängige Produktion von Gerinnungsfaktor Xa herunter regulieren. Matrix-induzierte Veränderungen des endothelialen Phänotypes und der Monozyteninteraktion scheinen den Einfluss der Monozyten auf die Gerinnungsaktivierung zu reduzieren, selbst bei signifikant erhöhter Anzahl an anwesenden Monozyten.

Obwohl es nach Kultivierung der Endothelzellen auf den Gelmatrices zur erhöhten bakteriellen Infektionsrate und zur gesteigerten Monozytenadhäsion kommt, schwächen die Matrices die zelluläre Reaktion, gemessen in Expression des TF, ab.

Für die Entwicklung des „optimalen Herzklappenersatzes“ sind diese Ergebnisse von Bedeutung. Ob die Matrix auch in vivo einen hemmenden Einfluss auf die prokoagulante Reaktion der infizierten Endothelzelle hat, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

## Abkürzungsverzeichnis

clfA	Clumping Faktor A
<i>C. burnetii</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
EC(s)	Endothelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal Calve Serum
FnBP A/B	Fibronektin Bindeprotein A/B
F V	(Gerinnungs-)Faktor V
F VII	(Gerinnungs-)Faktor VII
F X / F X(a)	(Gerinnungs-)Faktor X / aktivierter Faktor X
F V (a)	aktivierter Faktor V
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IE	Infektiöse Endokarditis
IL-	Interleukin- (1, 6, 8, 10..)
IgG	Immunglobulin G
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein
MSCRAMMs	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MPS	Monozytäres Phagozytisches System
NBTV	Nicht Bakterielle Thrombotische Vegetationen
NGS	Nutrient Goat Serum
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. viridans</i>	<i>Streptococcus viridans</i>
<i>S. bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
TE	Tissue Engineering
TF	Tissue Faktor

TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule 1

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die infektiöse Endokarditis	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie	1
1.1.2. Pathogenese	3
1.2. Bakterienstämme und Virulenzfaktoren	6
1.3. Tissue Engineering	8
1.4. Zielsetzung	10
2. Materialien, Bakterien und Geräte	12
3. Methoden	14
3.1. Isolation und Kultur der Endothelzellen	14
3.2. Kultur der Monozyten	15
3.3. Herstellung der Matrices	15
3.3.1. Herstellung des Fibringels	15
3.3.2. Herstellung des Kollagengels	15
3.4. Bakterien und deren Wachstumsbedingungen	16
3.5. Färben der Zellkerne mittels DAPI	16
3.6. Infektionsassay	17
3.6.1. Infektionsassay ohne Endothelzellen	17
3.6.2. Infektionsassay mit Endothelzellen	17
3.7. Durchflusszytometrieanalyse (Facs Analyse) der Oberflächenmoleküle	20
3.8. Analyse der Zytokinproduktion mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	21
3.9. Monozytenadhäsion	22
3.10. Bestimmung der prokoagulanten Aktivität	22
3.11. Statistische Analyse	23
4. Ergebnisse	24
4.1. Bestimmung der Zellkerndichte mittels DAPI-Färbung	24
4.2. Infektionsassay	25
4.2.1. Bakterienadhäsion an Matrices ohne Endothelzellen	25
4.2.2. Bakterielle Infektion der Endothelzellen	26
4.3. Proinflammatorische Aktivierung der auf den Matrices kultivierten Endothelzellen	29
4.3.1. Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen	30
4.3.2. Endotheliale Zytokinproduktion nach bakterieller Infektion	35
4.4. Adhäsion von Monozyten	37
4.5. Prokoagulante Aktivität	39
4.5.1. Prokoagulante Aktivierung der Endothelzellen	40
4.5.2. Prokoagulante Aktivierung in Kokultur mit Monozyten	41

5. Diskussion	43
6. Schlussfolgerung	53
7. Literatur – und Quellenverzeichnis	54
8. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis	60
9. Lebenslauf	61
10. Danksagung	62
11. Eidesstattliche Versicherung	63

## 1. Einleitung

### 1.1. Die infektiöse Endokarditis

#### 1.1.1. Definition und Epidemiologie

Die infektiöse Endokarditis (IE) ist eine akute Entzündung des Endokards, die zur Zerstörung des Gewebes führt sowie Ursache der Bildung septischer Emboli sein kann (Stock and Sahn 2000; Moreillon and Que 2004; Baddour et al. 2005). Sie tritt als schwerwiegende Erkrankung besonders bei Patienten nach Herzklappenersatz auf und kann zur Zerstörung der Herzklappe führen (Moreillon and Que 2004). Am häufigsten betroffene Strukturen sind die Herzklappen, insbesondere die Mitral – und Aortenklappe. Auch benachbarte endotheliale Strukturen sowie Patch-Material als auch Arterio-venöse-Shuntverbindungen können von der IE betroffen sein. Vorschädigungen des Herzens, Virulenz der Erreger und Abwehrlage des Patienten bestimmen das Krankheitsbild. Häufig befällt die IE einen bereits defekten Klappenapparat (Herold 2013). Die Inzidenz beträgt 2-7 Neuerkrankungen/100000/Jahr in westlichen Industrieländern. 5% der Betroffenen sind Kinder. In der Mehrzahl der erkrankten Kinder findet sich eine zu Grunde liegende kongenitale Herzerkrankung. (Mylonakis and Calderwood 2001; Hoen 2006).

Die akute IE wird durch eine Bakteriämie mit Erregern hoher Virulenz (z.B. *S. aureus*, Pneumokokken) ausgelöst, die auch an intakten Herzklappen zu ausgedehnten Zerstörungen führt (Herold 2013).

Die subakute IE befällt meist vorgeschädigte Herzklappen, ist charakterisiert durch einen elongierten Krankheitsverlauf über mehrere Wochen und wird ausgelöst durch Erreger geringerer Virulenz wie *Streptococcus viridans* oder *S. epidermidis* (Milazzo and Li 2001; Day et al. 2009).

Während die Häufigkeit der Streptokokkenendokarditis in den letzten Jahren rückläufig ist, nehmen Endokarditiden durch Staphylokokken und seltenere Erreger insbesondere durch Verwendung prothetischer Materialien in der Medizin zu (Herold 2013).

Die Diagnose der IE ist weiterhin eine klinische und diagnostische Herausforderung. Die unspezifischen Allgemeinsymptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, Schwäche, Gewichtsverlust und Arthralgien erschweren das rechtzeitige Erkennen. Nicht selten entsteht ein Zeitintervall von bis zu 5 Wochen

zwischen Erkrankungsbeginn und Diagnosestellung (Stock and Sahn 2000; Milazzo and Li 2001; Day et al. 2009). Zur klinischen Diagnosestellung bedient man sich der (modifizierten) Duke-Kriterien (Durack et al. 1994; Tissieres et al. 2003). Die Duke-Kriterien stützen sich auf Haupt – und Nebenkriterien. Je nach Anzahl der erfüllten Kriterien wird in eine definitive, mögliche oder ausgeschlossene IE eingeteilt.

### **Definition der Duke-Kriterien (Herold 2013)**

#### **Hauptkriterien**

- **kultureller Nachweis einer IE**
  - A. typische, IE-verursachende Mikroorganismen, mindestens 2 Blutkulturen
    - I. *S. viridans*, *S. bovis* oder HACEK-Organismen\*
    - II. *S. aureus* oder *Enterococcus*
  - B. Mikroorganismen, passend zur IE aus wiederholt positiven Blutkulturen
  - C. Positive Kultur für *C. burnetii* / IgG – Antikörper für *C. burnetii* >1:800
- **Hinweis auf eine endokardiale Beteiligung**
  - A. Positives Echokardiogramm für eine IE
    - I. flottierende intrakardiale Masse auf einer Herzklappe / Implantat
    - II. Abszess
    - III. Neue Dehiszenz einer Klappenprothese
  - B. Neue Klappeninsuffizienz

#### **Nebenkriterien**

- Prädisposition: Herzfehler / intravenöser Drogenmissbrauch
- Fieber über 38°C
- Vaskuläre Befunde: arterielle Embolien, septische Lungeninfarkte, mykotische Aneurysmen, intrakranielle / konjunktivale Hämorrhagien, Janeway-Läsionen
- Immunologische Befunde: Glomerulonephritis, Osler-Knötchen, Roth's Spots, Rheumafaktoren
- Mikrobiologische Hinweise: positive Blutkultur, ohne die Hauptkriterien zu erfüllen, oder serologischer Hinweis für eine Infektion mit zur IE passenden Organismen
- Echokardiographische Befunde passend zur IE, ohne die Hauptkriterien zu erfüllen

\***HACEK**- Organismen:

*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella*

In der Diagnosefindung spielt nach wie vor die Echokardiographie, insbesondere die transösophageale Echokardiographie, eine entscheidende Rolle, womit häufig die Diagnose gestellt werden kann (positive Voraussagemöglichkeit 90%).

Die Prognose der Erkrankung unter Behandlung mit Antibiotika ist abhängig von Vorschädigung des Herzens, Abwehrlage des Organismus, Lebensalter, Virulenz der Erreger und Zeitpunkt des Behandlungsbeginns. Auf Grund von schwerwiegenden Komplikationen wie septischen Embolien, die zu ernsthaften neurologischen und infektiösen Komplikationen führen können, sowie der Schwierigkeit der Identifikation und Behandlung der Krankheitsursache hat die IE eine Letalität von bis zu 18% (Baddour et al. 2005; Murdoch et al. 2009).

### 1.1.2. Pathogenese

Die initiale Phase der IE ist bestimmt durch die Interaktion von Bakterien und Endothelzellen. Hierbei ist die Virulenz der Bakterien entscheidend für das Ausmaß der Adhäsion an die Endothelzellen als auch für die Invasion der Bakterien. Dies ermöglicht eine hämatogene Ausbreitung der Bakterien in andere Gewebe. (Lowy 1998; Moreillon and Que 2004). Basierend auf einer ersten Theorie zur Pathogenese der IE nach Angrist and Oka (Angrist and Oka 1963) und ergänzenden weiteren Untersuchungen durch verschiedene Arbeitsgruppen wird das komplexe Krankheitsentstehen im Wesentlichen in folgende Schritte zusammengefasst:

Die bakterielle Kolonisation des Endothels führt zu einer Aktivierung der inflammatorischen und prokoagulanten Reaktion des Organismus. Dies begünstigt die Entstehung von Vegetationen. Vegetationen bestehen aus einem Netzwerk auf Fibrin und Thrombozyten, angereichert mit Bakterien (Lopes-Bezerra and Filler 2003).

Intaktes Endothel bietet im Allgemeinen einen guten Schutz gegenüber der Invasion und Translokation einzelner Bakterien (Durack 1975). Vorbestehende endokardiale Läsionen bei z. B. Klappenerkrankungen bilden den Ausgangspunkt für die Entstehung turbulenter Strömungen. Hierunter können nicht-bakterielle, thrombotische Vegetationen (NBTV) entstehen, die einen Ausgangspunkt für sekundäre Infektionen bilden können (Böcker 2008). Im Rahmen einer Bakteriämie (z.B. durch Zahnoperationen oder Infektion eines extrakardialen Organs) kann an den NBTV eine sekundäre Infektion entstehen (Moreillon et al. 2002). Alternativ können Bakterien mit extrem hoher Virulenz wie *S. aureus* ohne Vorschaden an das Endothel adhären und einen primären Schaden herbeiführen (Lowy 1998; Moreillon et al. 2002).

## Monozyten/Makrophagen

Monozyten sind Bestandteile des monozytären phagozytischen Systems (MPS). Monozyten sind Teil des spezifischen und unspezifischen Immunsystems. Sie sind die Vorläufer der Makrophagen. Zirkulierende Monozyten messen 10-11µm im Durchmesser und enthalten Lysosomen im Zytoplasma. Die wichtigsten Enzyme sind saure Phosphatasen, Esterasen, Proteasen und die Myeloperoxidase (Böcker 2008). Monozyten spielen im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr eine große Rolle in der inflammatorischen Reaktion des Organismus. Ihre wesentlichen Aufgaben umfassen die Phagozytose von Bakterien, die Stimulation proinflammatorischer Pathways sowie die Aktivierung von Fibroblasten und die Induktion der Angiogenese (Böcker 2008). Unter Interaktion mit Bakterien wird eine Reihe von endothelialen Oberflächenmolekülen aktiviert. Hierunter sind für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit das intercellular adhesion moleküle 1 (ICAM-1; CD54) sowie das vascular adhesion molecule (VCAM-1; CD 106) von Bedeutung, woran die Monozyten binden. Endothelzellen und Monozyten produzieren nach Aktivierung zudem Zytokine und Chemokine (Mattsson et al. 1993; Vernier et al. 1996; Veltrop et al. 1999; Veltrop et al. 2001; Chia et al. 2002; Moreillon et al. 2002).

## Inflammation

Eine akute Entzündungsreaktion geht mit vaskulären und zellulären Reaktionen einher, die parallel ablaufen und über chemische Faktoren reguliert werden. Nach einer ersten hyperämischen Phase entwickelt sich im entzündeten Gewebe durch Steigerung der Permeabilität ein interstitielles Ödem. Leukozyten wandern aus dem Blut in das Gewebe. Diese Rekrutierung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe ist entscheidend für die Entzündungsreaktion. Im Rahmen des Entzündungsprozesses werden an der Oberfläche von Endothelzellen und Leukozyten Adhäsionsmoleküle exprimiert, die über eine Liganden-Rezeptor-Erkennung zu endothelial-leukozytären Bindungen führen. In der vorliegenden Arbeit spielt, wie oben bereits aufgeführt, insbesondere die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, die als Marker für die stabile Adhäsion von Leukozyten an das Endothel verstanden werden können.

Zytokine sind wichtige humorale Komponenten des Immunsystems. Unter dem Begriff Zytokine werden eine große Anzahl Faktoren zusammengefasst, die in einem komplexen Netzwerk zwischen den einzelnen Bestandteilen des Immunsystems vermitteln, Zellwachstum und Differenzierung von Zellen regulieren (Böcker 2008). Hierzu zählen unter anderem Interleukin-1 (IL-1),

Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und das anti-inflammatorische Interleukin-10 (IL-10).

### Gerinnung

Die Aktivierung des Gerinnungssystems ist ein Hauptbestandteil der IE. Sowohl die bakteriellen als auch die körpereigenen Oberflächenmoleküle manipulieren die Bildung und Freisetzung des Gewebethromboplastins oder Tissue Faktors (TF), der initiale Auslöser der extrinsischen Gerinnungskaskade. TF ist ein Glykoprotein, das aus einer Polypeptidkette mit 263 Aminosäuren besteht. Das Molekulargewicht beträgt 46kDa (Lopes-Bezerra and Filler 2003). Die Freisetzung von TF nach Schädigung des Endokards führt zur Bildung eines Komplexes von TF, Faktor (F) VIIa und Calcium, welcher die Umwandlung von FX zu FXa in Gang setzt. Ebenso wird die Umwandlung von FIX zu FIXa durch den Komplex aus TF, FVIIa und Calcium gestartet, was die Bildung von FX zur Folge hat. Die aktivierte Form des FX, FXa, ist Bestandteil des Komplexes aus FVa, FXa, Calcium, Phospholipiden und Prothrombin. Dieser Komplex aktiviert Prothrombin zu Thrombin, welches aus Fibrinogen Fibrin spaltet. TF wird von Zellen im Subendothel gebildet, von Zellen, die nicht mit fließendem Blut in direktem Kontakt stehen (Eilertsen and Osterud 2005; Tilley and Mackman 2006). Endothelzellen und Monozyten jedoch exprimieren TF im Rahmen einer Entzündungsreaktion, in vorhergehenden Experimenten nach Stimulation mit *S. aureus*, *S. sanguis*, *S. epidermidis* gezeigt (Bancsi et al. 1996; Bancsi et al. 1996; Bancsi et al. 1998). Ebenso ist bekannt, dass Zytokine und bakterielle Bestandteile die Expression von TF vervielfachen können (Camerer et al. 1996; Hahn et al. 2007; Mattsson et al. 2008).

## 1.2. Bakterienstämme und Virulenzfaktoren

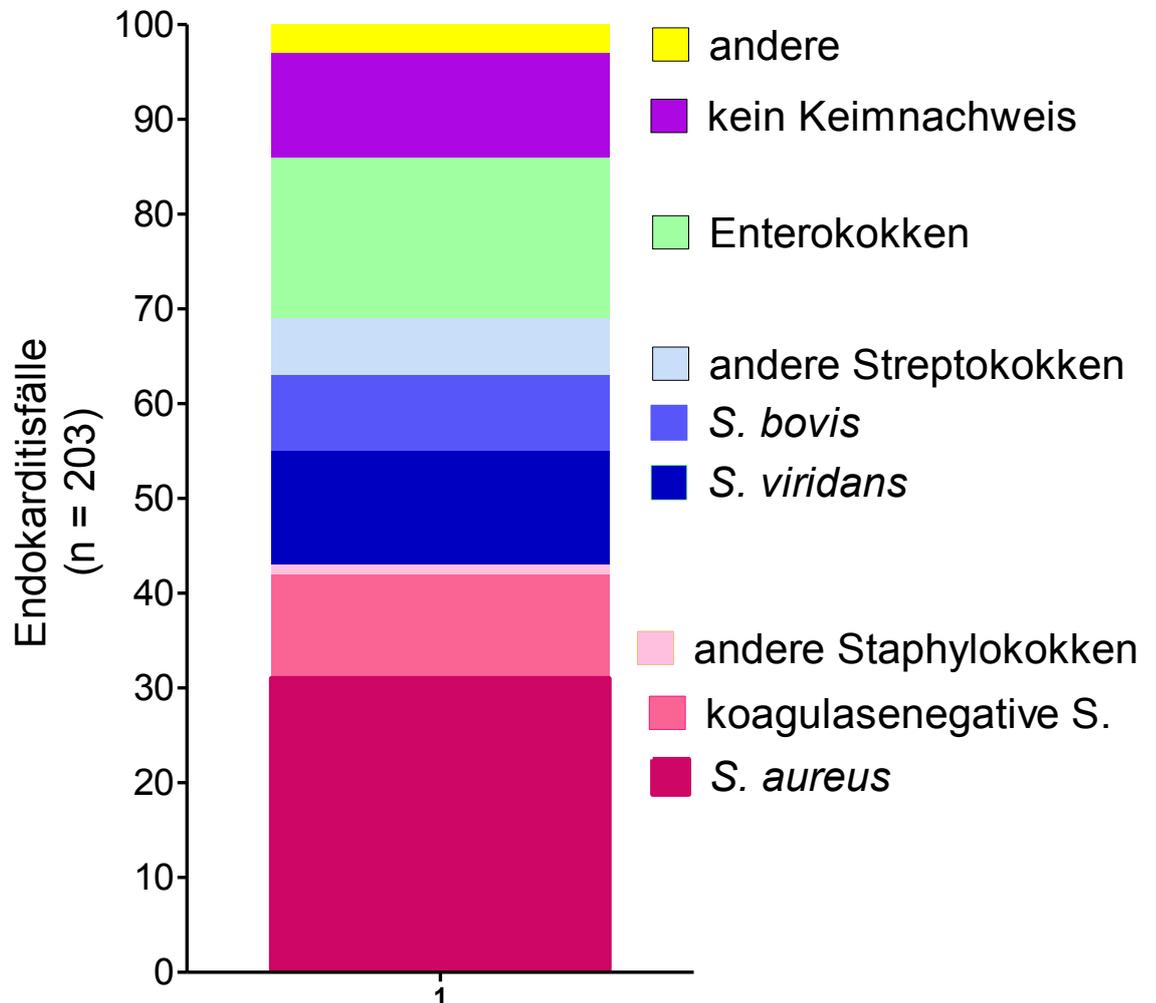


Abb. 1: Bakterienverteilung Infektiöse Endokarditis (Hill et al. 2007)

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Erreger der Infektiösen Endokarditis (Hill et al. 2007).

### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* ist ein opportunistischer Erreger, gehört zu den Gram-positiven Haufenkokken und ist ca. 0,8-1,2µm groß. Das Bakterium ist weit verbreitet. *S. aureus* kommt asymptomatisch als Kolonisationskeim auf der Haut und insbesondere in den oberen Atemwegen des Menschen vor. Die Inzidenz von ambulant oder hospitalisiert erworbenen Infektionen durch den Erreger steigt stetig. Zunehmende Resistenzen gegenüber Antibiotika erschweren die Therapie (Lowy 1998; Moreillon and Que 2004). In 25-35% aller Endokarditisfälle, die mit

schwerer Degeneration der Herzklappe sowie systemischen Komplikationen einhergehen, ist *S. aureus* der Erreger. Zur Risikogruppe gehören heute Patienten mit intravenösem Drogenabusus, ältere, immungeschwächte Patienten, Patienten mit künstlichen Klappenersatz sowie Patienten mit erhöhtem Risiko für Hospitalinfektionen.

Die Pathogenität des Bakteriums wird durch das Vorhandensein von speziellen Oberflächenmolekülen, den MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), bestimmt (Bancsi et al. 1996; Moreillon et al. 2002; Moreillon and Que 2004; Eichinger et al. 2005).

Diese Oberflächenmoleküle besitzen eine hohe Affinität zu Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM). Zu nennen sind die Fibronectin-Binding-Proteine FnBPA und FnBPB sowie der Clumping Faktor A (clfA) (Lowy 1998; Sinha et al. 2000; Que et al. 2001; Menzies 2003; Loughman et al. 2005; Schwarz-Linek et al. 2006). Nach Bindung von FnBP an Fibronectin bilden die Bakterien Brückenverbindungen zu Fibronectinrezeptoren der Endothelzelle. Über eine Bindung von ClfA an Fibrinogen werden Thrombozyten aktiviert (Massey et al. 2001; Loughman et al. 2005). So kann *S. aureus* an der Zelle adhären. Wie oben schon beschrieben, führt die Adhäsion von Bakterien an die Endothelzelle (EC) zur Antwortreaktion derselben. Zelloberflächenmoleküle wie die Adhäsionsproteine ICAM-1 und VCAM-1 werden exprimiert, Zytokine und Chemokine sezerniert (Beekhuizen et al. 1997; Veltrop et al. 1999).

### *Streptococcus sanguis*

*S. sanguis* gehört zur Gruppe der Viridans-Streptokokken. Viridans-Streptokokken sind Gram-positive alpha-hämolytische Kettenkokken. Häufiges Vorkommen ist im Mund-Rachen-Raum. Viridans-Streptokokken sind die häufigsten Erreger der Endocarditis lenta (Holtmann 2008). Die Krankheitssymptome sind unspezifisch und schleichend, die Komplikationsrate geringer als bei der akuten Form der IE (Day et al. 2009). 26% der Endokarditisfälle bei Erwachsenen werden durch *S. sanguis* hervorgerufen (Hill et al. 2007). *S. sanguis* präsentiert auf seiner Oberfläche Proteine, die Glucane, mit Bindefähigkeit an Fibringerinnseln (Scheid et al. 1978). Zudem haben die Viridans-Streptokokken die Möglichkeit, an Endothelzellen (ECs) zu binden und zur Expression der Oberflächenmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 zu führen. Des Weiteren kommt es ebenfalls zur Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8 (Vernier et al. 1997; Veltrop et al. 1999; Stinson et al. 2003; Yeh et al. 2006).

### *Staphylococcus epidermidis*

*S. epidermidis* gehört zu den Gram-positiven, koagulasenegativen Haufenkokken und ist natürlicherweise auf der menschlichen Hautflora zu finden. In 30% der erwachsenen Patienten mit IE eines implantierten Klappenersatzes sowie in 8% der akuten IE findet sich *S. epidermidis* als Erreger (Monk et al. 2008). Auch in der Pädiatrie sind 8% der IE nach Klappenersatz auf eine Infektion mit *S. epidermidis* zurückzuführen (Stock and Sahn 2000; Day et al. 2009). Häufig werden nosokomiale Infektionen bei geschwächter Abwehrlage durch *S. epidermidis* ausgelöst. Durch die Bildung eines Biofilms auf polymeren Oberflächen sind die koagulase-negativen Staphylokokken nicht selten Auslöser von Infektionen nach Implantation von Fremdmaterial sowie Infektionen durch Verweilkatheter oder Drainagen (Moreillon and Que 2004; Monk et al. 2008; Piette and Verschraegen 2009). Der Anteil von *S. epidermidis* an diesen Infektionen beträgt 70-80% (Lode 2004). In der Medizin werden zunehmend Kunststoffe in Diagnostik und Therapie verwendet, was zur Zunahme der Infekte unter Bildung eines Biofilms führt. Ungefähr die Hälfte aller nosokomialen Infektionen ist auf diesen Pathomechanismus der Staphylokokken zurückzuführen (Patti 2005). Die Symptomatik der IE nach Infektion mit *S. epidermidis* unterscheidet sich kaum von der Infektion mit den Viridans-Streptokokken. Wie oben beschrieben, ist zudem der Pathomechanismus der Bildung des Biofilms für die Virulenz von *S. epidermidis* von entscheidender Bedeutung. Der komplexe Ablauf ist bisher nicht vollständig entschlüsselt (Nilsdotter-Augustinsson et al. 2005). Nach Infektion mit *S. epidermidis* werden ebenfalls die Oberflächenmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 exprimiert, Monozyten adhärieren und produzieren Zytokine wie IL-1, IL-6 (Mattsson et al. 1993; Mehlin et al. 1999). *S. epidermidis* alleine hat nur eine geringe prokoagulante Aktivität, nach Kontakt mit Monozyten zeigt sich aber eine relevante Erhöhung derselben (Veltrop et al. 1999; Veltrop et al. 2001).

### 1.3. Tissue Engineering

Tissue Engineering (TE) bedeutet Gewebekonstruktion bzw. Gewebezüchtung. Durch Kultivierung spezifischer Zellen auf einer Trägermatrix wird ein künstliches biologisches Gewebe hergestellt, das erkranktes Gewebe beim Menschen ersetzen soll. Die zu kultivierenden Zellen werden dem Patienten entnommen und in-vitro vermehrt. Daran schließt sich die Kultivierung als Monolayer oder auf speziell angefertigten Gerüsten in dreidimensionaler Form an, die dem

Empfänger (re-)implantiert werden sollen (Lindl 2008). In dieser Arbeit beziehen wir uns im Speziellen auf Tissue Engineering im kardiovaskulären Bereich. In der Herzchirurgie werden heute Herzklappengerüste mit patienteneigenen Gefäßendothelzellen besiedelt (Sodian et al. 2000; Steinhoff et al. 2000; Jockenhoevel et al. 2001; Mol and Hoerstrup 2004).

Obwohl kontinuierliche Verbesserungen in der Therapie zu verzeichnen sind, ist die Implantation von künstlichen oder biologischen Herzklappen nach wie vor mit Komplikationen wie IE und Einschränkungen durch Nebenwirkungen verbunden. Beschränkend sind zum Beispiel die begrenzte Lebensdauer biologischer Klappen oder das erhöhte Blutungsrisiko durch die notwendige Antikoagulation nach Implantation von künstlichen Klappen (Shanmugam et al. 2005; Hill et al. 2008). Um die Risikofaktoren nach Herzklappenimplantation zu verringern und die Kompatibilität zu erhöhen, wird in diese Richtung stetig weiter geforscht. Das Ziel des kardiovaskulären Tissue Engineerings ist die Kultivierung einer vollständig autologen Struktur. Abbildung 2 beschreibt die Herstellung einer solchen Klappenprothese, die am Helmholtzinstitut der RWTH Aachen entwickelt wurde (Helmholtz-Institut).

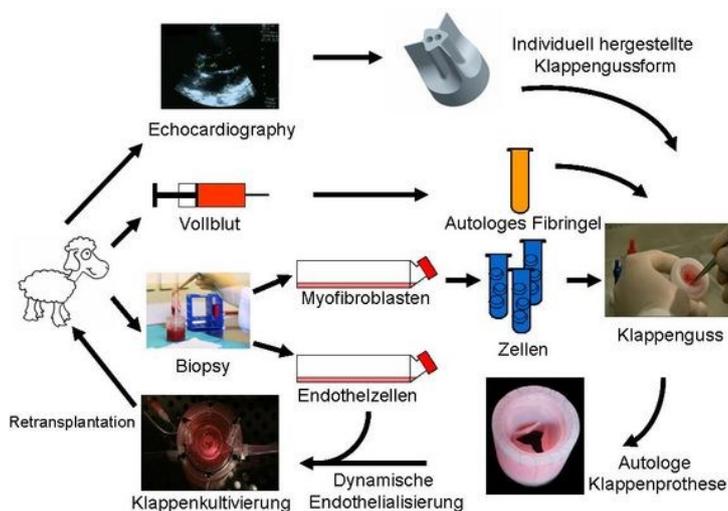


Abb. 2: Prinzip der Herzklappenherstellung auf der Basis einer Fibrinmatrix  
 Aus: Helmholtz-Institut, RWTH Aachen, Department of Tissue Engineering and Textile Implants,  
[www.ame.hia.rwth-aachen.de](http://www.ame.hia.rwth-aachen.de)

Das Ziel von Tissue Engineering ist, eine vollständig autologe Herzklappe zu schaffen, die aus patienteneigenem Material besteht und somit eine höhere Biokompatibilität und Lebensdauer hat (Sodian et al. 2000; Steinhoff et al. 2000;

Jockenhoevel et al. 2001; Mol and Hoerstrup 2004). Die entnommenen Endothelzellen werden, wie oben beschrieben auf einer Matrix angesiedelt. Hierzu wurden bereits resorbierbare synthetische Materialien, Hydrogele, natürliche Polymere (Kollagen, Fibrin, Elastin) oder azelluläre xenogene Gewebe untersucht (Sodian et al. 2000; Steinhoff et al. 2000; Teebken et al. 2003; Vesely 2005; Mol et al. 2006; Stock and Schenke-Layland 2006; Dohmen and Konertz 2009; Filova et al. 2009; Schaefermeier et al. 2009). Auf der Suche nach der theoretisch idealen Herzklappe wird zum Beispiel Fibrin der Hauptbestandteil des Grundgerüsts verwandt. Vielversprechende Ergebnisse konnten bereits im Tierversuch mit Schafen gezeigt werden (Flanagan et al. 2009). Ebenso steht Kollagen als Matrix unter aktuellen Untersuchungen (Shi et al. 2005; Vesely 2005; Balguid et al. 2007; Robinson et al. 2008).

Fibrin und Kollagen spielen eine große Rolle bei der prokoagulanten und inflammatorischen Reaktion von Zellen.

Die Verwendung von Matrices auf der Basis von Kollagen oder Fibrin, die dann mit menschlichen Endothelzellen besiedelt werden, ist einer der Anwendungsbereiche des Tissue Engineering (Jockenhoevel et al. 2001; Taylor et al. 2002; Taylor et al. 2006).

Unter dem Gesichtspunkt, dass die beiden Materialien als Grundgerüst einer autologen Herzklappe in Frage kommen könnten, ist die Interaktion mit Bakterien von großer Bedeutung. Aus diesem Grund werden diese beiden Materialien in der vorliegenden Arbeit miteinander verglichen.

#### 1.4. Zielsetzung

Die Zusammenhänge zwischen der Matrix des potenziellen Klappengerüsts im Rahmen des Tissue Engineering (TE) und der bakteriellen Infektion sollten in dieser Arbeit untersucht werden. Aus diesem Grund benutzen wir in unseren Untersuchungen ein Modell, das auf dem Prinzip von TE beruht. Hierbei besteht die Herzklappe in der Zukunft aus einem Klappengerüst, das mit patienteneigenen Endothelzellen besiedelt wird. Die Endothelzellen wurden auf einer Matrix kultiviert, deren Einfluss auf die Entzündungsreaktion in unserer Studie untersucht werden sollte.

Ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der bakteriellen Endokarditis ist, wie oben beschrieben, die Adhäsion von Bakterien an das Endothel der Herzklappe. Hierbei spielen verschiedene zelluläre und bakterielle

Oberflächenmoleküle eine Rolle sowie die Aktivierung von Leukozyten (Veltrop et al. 2001).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist der Keim mit der größten Pathogenität unter den Endokarditis verursachenden Bakterien, aber auch *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*) und *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) spielen als Erreger eine Rolle (Peacock et al. 2000; Veltrop et al. 2000; Moreillon and Que 2004). Die Interaktion zwischen Bakterium, Endothelzelle und aktivierten Monozyten ist entscheidend für die Entstehung der Endokarditis. Man geht derzeit davon aus, dass zuerst Bakterien an das intakte oder beschädigte Endothel anhaften und dieses invadieren. Nach Bakterienkontakt werden die Endothelzellen aktiviert. Ausdruck der endothelialen Aktivierung sind unter anderem die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) sowie die Produktion von Zytokinen (Veltrop et al. 1999; Veltrop and Beekhuizen 2002). Ebenso wird Gewebsthromboplastin an der Zelloberfläche exprimiert, was die Gerinnungskaskade in Gang setzt (Veltrop et al. 2001; Veltrop and Beekhuizen 2002). Hierbei kommt es zur Steigerung der prokoagulanten Aktivität mit Thrombenbildung an den Herzklappen. Diese durch die bakterielle Infektion getriggerten Veränderungen der Endothelzellen sollten in dieser Arbeit auf unterschiedlichen Matrices untersucht werden.

Die Adhäsion von Bakterien an Endothelzellen konnte bereits im *in-vitro*-Modell gezeigt werden. Diese Erkenntnisse zur Adhäsion zwischen unterschiedlichen Bakterien und Endothelzellen aus den *in-vitro*-Versuchen sollten in dieser Arbeit auf ein Modell aus mit Endothelzellen besiedelten Gelmatrices übertragen werden. Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob die Interaktion zwischen Bakterien und Endothelzellen sich ändert, wenn die Endothelzellen auf verschiedenen Gelmatrices kultiviert werden. Dabei sollte die Adhäsion der Bakterien an die Endothelzellen sowie die proinflammatorische und prokoagulante Aktivierung der Zellen untersucht werden.

Es sollte gezeigt werden, in wie weit

1. die Adhäsion der Bakterien an die ECs abhängig von den unterschiedlichen Matrices ist,
2. die proinflammatorische Reaktion (Expression von ICAM-1 und VCAM-1, endotheliale Zytokinproduktion) der ECs eine Abhängigkeit von den unterschiedlichen Matrices zeigt,
3. die prokoagulante Aktivität der ECs mit und ohne Anwesenheit von Monozyten unterschiedliche Ausprägung auf den Matrices zeigt.

## 2. Materialien, Bakterien und Geräte

CCH-B-Agar; Oxoid Microbiology products, Thermo Scientific, Hampshire, UK  
PBS; Dulbecco instamed 9,55g/l; Biochrom, Berlin  
Neutralisationspuffer; BioWhittaker, Verviers, Belgien  
TBS (tris buffered saline); Biochrom, Berlin  
BSA (Bovines Serum Albumin); Applichem GmbH, Darmstadt  
Ethanol 70%; Karl Roth GmbH+Co, Karlsruhe  
HBSS ohne Ca/Mg, Nr. 14175-053; Gibco, Auckland, NZ  
HBSS, Nr. 14025-050, Gibco, Auckland, NZ  
HEPES 1M Puffer; BioWhittaker, Verviers, Belgien  
Foetales Kälberserum (FCS) Nr. S-0115, Seromed, Biochrom, Berlin  
Trypsin; Biochemisches Institut, Universität Münster  
EDTA, Biochrom, Berlin  
Kollagenase 0,2%, 10 103 586 001, Roche, Deutschland  
M199, ATCC, Manassas, USA  
EC-Medium + supplement pack, Promocell GmbH, Heidelberg  
RPMI 1640, Gibco, Auckland, NZ  
Gelatine, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Paraformaldehyd, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
DAPI-Färbung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Monozytenfärbung BCECF (2',7'-bis(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein);  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Saponin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany  
Todd-Hewitt Broth; Oxoid Microbiology products, Thermo Scientific, Hampshire,  
UK  
Nutrient Broth II; Oxoid Microbiology products, Thermo Scientific, Hampshire, UK  
Humanserum; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim  
IL-1; R&D Systems, UK  
Penicillin-Streptomycin; MP Biomedicals, Santa Ana; USA  
Goat Serum; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Foetales Kälberserum (FCS) Nr. S-0115; Seromed, Biochrom, Berlin  
PefachomeFXa, Kordia Life Sciences, Leiden, NL  
Faktor X, Enzyme Research Laboratories, Swansea, UK  
50% Essigsäure, 0,1% Essigsäure; Arthro-Kinetics, Esslingen  
Fibrinogen (plasminogenfrei); Sigma, Seelze  
Kollagen 6mg/ml in Essigsäure 0,1%; Arthro Kinetics, Esslingen, Deutschland

Anti-CD54 (ICAM-1) mAb 15.2; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA  
Anti-D106 (VCAM-1) mAb 1g11B1; Biosource International, Camarillo, USA  
Phycoerythrin goat-anti-mouse Ig, Southern Biotechnology Associates Inc.,  
Birmingham, USA  
PeliKine Compact™ human IL-8 enzyme-linked immunosorbent assay kit;  
Sanquin, Amsterdam, Niederlande  
Cytoset™ immunoassay kit; Biosource International, Camarillo, USA

*Staphylococcus aureus 42D*

*Staphylococcus epidermidis ATCC 14990*

*Streptococcus sanguis NCTC 7864;*

Labor für Infektiologie, Dr. H. Beekhuizen, Universität Leiden, Niederlande

Zentrifuge; Rotanta TRC, Hettich, Berlin

Wasserbad, Köttermann Labortechnik, Hänigsen

Brutschrank; Heraeus, Kendro Laboratory Products, Langenselbold

Vortexer; Heidolph, Schwabach

Ultraschallsonde; Bandelin electronic; Berlin

Tegadermfolie; 3M, Neuss

Zellkulturschalen, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Wellplatten, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Fluoreszenzmikroskop ApoTome; Zeiss

Spektrophotometer; Beckmann Coulter Du640B, Beckmann, Fullerton, USA

Tecan Infinite M200 photometer; Tecan, Crailsheim

FACScan; Becton Dickinson FACSCaliber, Franklin Lakes, USA

### 3. Methoden

#### 3.1. Isolation und Kultur der Endothelzellen

Für die Experimente wurden humane Endothelzellen verwendet, die aus der Vena saphena magna mittels Kollagenase isoliert wurden. Bei den verwendeten Venenstücken handelte es sich um nicht benötigte Stücke von Patienten, die eine Bypassoperation der Herzkranzgefäße erhielten. Ein schriftliches Einverständnis der Patienten lag vor. Die Endothelzellen wurden aus der Vene mit 0,2% Kollagenase herausgelöst. Zunächst wurde die Vene unter sterilen Bedingungen mit 10ml PBS-Puffer von außen und innen gespült, wobei die Venenklappen die Spülrichtung vorgeben. Im Anschluss wurde die Vene mit der Kollagenaselösung gefüllt und beide Enden mit chirurgischen Klemmen verschlossen. Die Kollagenase löste die Endothelzellen, die das Venenlumen von innen auskleiden, von der Tunica media. Dieser Vorgang benötigte 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C. Nach Ablauf der Zeit wurde der Lysevorgang mittels 10 ml Stopp-Medium (M199+10% FCS, s.o.) und 10 ml PBS-Puffer unterbrochen, welche mit Hilfe einer Spritze kräftig durch das Venenlumen gespült wurden. Die Flüssigkeit, die nun auch die abgelösten Endothelzellen enthielt, wurde in einem sterilen Röhrchen aufgefangen. Die abgelösten Endothelzellen wurden nun für 10 min. bei 312,9 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend in 1-2 ml Endothelzellmedium aufgenommen. Nach der Isolation wurden die Endothelzellen in Zellkulturschalen kultiviert, die zuvor 30 min. mit 0,75 % Gelatine beschichtet wurden. Die frisch isolierten Endothelzellen wurden als Passage 0 bezeichnet. Die Zellen wuchsen in Passage 0 innerhalb von 3-5 Tagen unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> zu einem konfluenten Monolayer. War dieses Stadium erreicht, wurden sie passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300µl Trypsin/EDTA für 3 min. bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin/EDTA löste die Zellen von der Oberfläche. Anschließend wurden die Zellen mit 500µl PBS in der Schale resuspendiert und dadurch zusätzlich mechanisch vom Plastik abgelöst. Die abgelösten Endothelzellen wurden erneut in Endothelzellmedium (4-4,5 ml) aufgenommen und die Suspension auf drei mit Gelatine beschichtete Zellkulturschalen verteilt. Diese Zellen wurden als Passage 1 bezeichnet. Für die Experimente wurden Zellen der Passage 2-3 verwendet. Hierzu wurden die Endothelzellen alternativ auf Fibringel, Kollagengel oder auf mit Gelatine beschichtete Wellplatten kultiviert.

### 3.2. Kultur der Monozyten

Verwendet wurde eine human monozytäre Zelllinie THP-1. Nach erstmaligem Auftauen wurden die Zellen in 7,5 ml RPMI 1640 mit 100 U/ml Penicillin G, 0,1 mg/ml Streptomycin und 10% FCS in einer Zellkulturflasche kultiviert. Nach 3 Tagen wurde das Medium erneuert und die THP-1 Zellen wurden auf 3 neue Zellkulturflaschen verteilt. Es konnte gezeigt werden, dass die Monozyten der THP-1 Zelllinie alle Oberflächenmoleküle exprimieren, die für die Interaktion mit Endothelzellen von Bedeutung sind. Ebenfalls aktivieren sie den extrinsischen Gerinnungsweg nach adäquater Stimulation (Veltrop et al. 2001; Veltrop and Beekhuizen 2002). Im weiteren Text werden die THP-1 Zellen als Monozyten bezeichnet. Vor der Verwendung wurden die Monozyten in M199 mit 10% HuSi resuspendiert.

### 3.3. Herstellung der Matrices

#### 3.3.1. Herstellung des Fibringels

Das humane Fibrinogen wurde in destilliertem Wasser gelöst und über Nacht über eine 6000-8000 Membran gegen TBS dialysiert. Nach steriler Filtration wurde die Konzentration des Fibrinogen im Photometer bei 280nm ermittelt. Der Extinktionskoeffizient betrug 1,5, was einer Konzentration der Fibrinlösung von 8mg/ml in TBS entspricht. Die Polymerisation des Fibringels wurde durch Zugabe von Thrombinlösung (40U/ml) und  $\text{CaCl}_2$  (50nM) erreicht. Die Fibrinlösung wurde in eine 24-Well-Zellkulturplatte gegeben. Dabei bedeckten 250  $\mu\text{l}$  Gellösung den Boden eines Wells. Das Fibringel erhärtete bei Raumtemperatur nach 10 min. Danach wurde 500  $\mu\text{l}$  sterile PBS in jedes Well gegeben und die Wellplatten bis zum Ausführen eines Experimentes im Inkubator aufbewahrt.

#### 3.3.2. Herstellung des Kollagengels

Das Kollagengel basierte auf Kollagen Typ I. Die fertige Kollagenlösung wurde in 6mg/ml 0,1% Essigsäure von Arthro-Kinetics geliefert. Die Lösung blieb bei 4°C flüssig. Vor Verwendung wurde die Lösung für 10 Minuten bei 700 x g zentrifugiert und 1:1 mit einem Neutralisationspuffer (2x DMEM / 2M N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure [0,93/0,07]) verdünnt. Jeweils 250  $\mu\text{l}$

des noch flüssigen Kollagensubstrates wurden auf den Boden eines Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte pipetiert. Die Polymerisation des Gels wurde durch die Erwärmung auf Raumtemperatur erreicht (10 min). Anschließend wurde 500 µl steriles PBS in jedes Well gegeben und die Wellplatten bis zum Ausführen eines Experimentes im Inkubator aufbewahrt.

#### 3.4. Bakterien und deren Wachstumsbedingungen

Für die Versuche wurden drei für die Endokarditis relevante Bakterienstämme verwendet: *Staphylococcus aureus* 42D (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 149900 (*S. epidermidis*) und *Streptococcus sanguis* NCTC 7864 (*S. sanguis*). Die Bakterien wurden bei -70 °C aufbewahrt und am Vortag des Versuches in eine Übernachtskultur gebracht (6 Stunden). Hierzu wurde jeweils eine Öse Bakteriensuspension den Arbeitsaliquots entnommen und in 10ml Medium gebracht. Für *S. epidermidis* und *S. sanguis* ist THB-Medium, für *S. aureus* NBII-Medium zu verwenden. Die Bakterien wurden für sechs Stunden in 37°C-Wasserbad kultiviert. *S. aureus* 42D wurde in Nutrient Broth II (NB) bei 37 °C bis zur log-Phase angezüchtet. Für *S. epidermidis* ATCC 149900 und für *S. sanguis* NCTC 7864 Todd-Hewitt Broth (THB) verwendet. Anschließend wurden die Bakterien in M199 mit 0,1% (w/v) Gelatine und 10% aktivem Humanserum für 30 min auf der Rotationsplatte bei 4 rpm opsonisiert. Die bakterielle Konzentration wurde im Photometer (Optische Dichte 600nm) bei einer Extinktion von 0,65 eingestellt. Mittels einer vorher erstellten Eichkurve wurden die Konzentrationen der verschiedenen Bakterien für die spezifischen Extinktionen bestimmt. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen bis zur gewünschten Konzentration verdünnt und in M199 mit 10% Hitze inaktiviertem Humanserum (HuSi, 20 min, 56°C) resuspendiert.

#### 3.5. Färben der Zellkerne mit DAPI

Um zu untersuchen, ob die Endothelzellen unter Kulturbedingungen auf Fibrinigel, Kollagengel und in der Polystyren-Zellkulturplatte gleich gut wuchsen, wurde die Anzahl der Endothelzellen pro Fläche bestimmt. Hierzu wurden die isolierten Endothelzellen in Passage 2 auf 6-Well-Zellkulturplatten (Fläche/Well: 9,6 cm<sup>2</sup>) und auf 24-Well-Zellkulturplatten (Fläche/Well: 3,8 cm<sup>2</sup>) ausgesät.

Die Endothelzellen lagen zu Beginn des Versuches in einem konfluenten Monolayer vor. Dieser wurde nun mit PBS gewaschen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Das Paraformaldehyd wurde nach dieser Zeit wieder abgewaschen und die Zellen wurden für 5 Minuten mit der DAPI-Färbung (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) inkubiert. Die DAPI-Färbung führte zu einer Blaufärbung der Zellkerne, wodurch sich diese optisch vom Zytoplasma abgrenzten. Die Färbelösung bestand aus dem Farbstoff DAPI, gelöst in PBS, und 2 % Saponin zur Zellpermeabilisierung.

Nach der Inkubationszeit wurde der Zellayer mit PBS gewaschen. Die Zahl der Zellkerne wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

### 3.6. Infektionsassay

#### 3.6.1. Infektionsassay ohne Endothelzellen

Um die Auswirkungen der beim Infektionsassay verwendeten Bakterien auf die Matrices zu überprüfen wurde die Infektion ebenfalls ohne Endothelzellbeschichtung durchgeführt. Hierbei sollte verglichen werden, ob die Matrices die Adhäsion der Bakterien unterschiedlich beeinflussen. Zur Vorbereitung mussten die Bakterien, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, in Übernachtskultur gebracht werden. Am Versuchstag wurden die Bakterien wie im folgenden Kapitel für den Versuch aufbereitet. Infiziert wurden Kulturschälchen, die wie unter Versuchsbedingungen mit Fibrinogen und mit Gelatine beschichtet waren. Die Ergebnisse wurden, wie dem folgenden Kapitel genauer zu entnehmen ist, in Prozent der Inokulationsdosis ausgedrückt.

#### 3.6.2. Infektionsassay mit Endothelzellen

Zur Vorbereitung mussten am Vortag des Versuches die zu verwendenden Bakterien in Übernachtskultur gebracht werden. Die Versuchsvorbereitung ist im vorangehenden Kapitel beschrieben worden. Am Versuchstag wurde jede Übernachtskultur (ÜNK) zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Die ÜNK wurde bei 2815,9 x g und 4 °C für 5 min. zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das Pellet wurde mit HBSS+Hepes resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Im Anschluss wurden die Bakterien opsoniert. Hierzu wurden sie mit 2 ml aktivem Humanserum und 8 ml

M199+Gelatine für 30 min. bei 37 °C auf dem Schüttler opsonisiert. Nach Zentrifugation wurden die Bakterien in M199 mit 0,1 % (wt/vol) Gelatine und 10 % (vol/vol) frischem, humanem Serum aufgenommen und für 30 min. unter Rotation (3 rpm) zwecks Opsonisierung inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Bakterien in PBS aufgenommen und im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm auf eine Extinktion von 650 eingestellt. Dies entsprach einer in Vorversuchen festgestellten Bakterienkonzentration für *S. aureus* von  $2 \times 10^8$  Bakterien/ml, *S. sanguis* von  $7 \times 10^8$  Bakterien/ml und *S. epidermidis* von  $1 \times 10^8$  Bakterien/ml. Für die von uns durchgeführten Versuche verdünnten wir die Bakterien in M199 mit 10 % hitzeinaktiviertem Humanserum an folgende Konzentrationen pro  $2 \times 10^5$  ECs:

<i>Staphylococcus aureus</i> :	$1 \times 10^6$ und $1 \times 10^7$
<i>Staphylococcus epidermidis</i> :	$5 \times 10^6$ und $5 \times 10^7$
<i>Streptococcus sanguis</i> :	$5 \times 10^6$ und $5 \times 10^7$

Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass >80% der Endothelzellen infiziert, aber nicht zerstört werden. Die MOI (multiplicity of infection) betrug in den Versuchen für *S. aureus* zwischen 5:1 und 50:1, für *S. epidermidis* und *S. sanguis* zwischen 25:1 und 250:1. Der Endothelzellmonolayer war nach einer Stunde Infektionszeit noch intakt. Die oben genannten Konzentrationen wurden in M199+10% inaktivem Humanserum eingestellt und in jeweils 1ml/Well auf die Endothelzellen in der 12-Wellplatte gegeben. Hierbei wurden in sechs Wells die Konditionen auf den Gelmatrices und in der Zellkulturplatte miteinander verglichen. Zur späteren Bestimmung der genauen Inokulationsdosis wurde als Kontrollwert von jeder eingestellten Konzentration 1ml in ein steriles Well gegeben.

Die Versuchsplatten werden für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Wells 10 mal mit HBSS+Hepes gewaschen und anschließend mit einer 0,5%igen Kollagenaselösung von der Matrix gelöst. Hierzu wurden die Versuchsplatten mit jeweils 500µl Kollagenase/Well für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Lysevorgang wurde jedes Well mit M199 auf 1ml aufgefüllt. Die Wells wurden nun einzeln unter sterilen Bedingungen für jeweils 20 Sekunden mit 10 % (Pulsationsmodus: Pro Sekunde 0,1 Sekunden Ultraschall, 0,9 Sekunden Pause) Ultraschall beschallt, um alle adhärennten Zellen und Bakterien vom Untergrund

und aus ihrem Zellverband zu lösen. Dabei wurden die Versuchsplatten unter sterilen Bedingungen mit Tegadermfolie verschlossen. Die Folie über den einzelnen Wells wurde mit einem sterilen Skalpell kreuzförmig eingeschlitzt und die Sonotrode in das Well getaucht. Beim Lysevorgang wurde explizit auf ein Enganliegen der Tegadermfolie geachtet, so dass die Wellinhalte der einzelnen Wells sich nicht untereinander vermischen konnten. Nur so ließ sich gewährleisten, dass die Bakterienkolonien sich trennten, so dass in der anschließenden Ausplattierung (Beschreibung der Vorgehensweise und der Verdünnungsreihe siehe unten) einzelne Bakterien nach 24 Stunden Inkubation einzelne Kolonien entwickelten. In der Auszählung konnte dann von den Kolonien auf der Blutagarplatte auf die ausplattierte Bakterienkonzentration geschlossen werden. Dieser Vorgang musste auch mit den Kontrollwells durchgeführt werden. Durch die Lyse und die Beschallung wurden die Endothelzellen zerstört und die adhärenen und invadierten Bakterien freigesetzt. Zur Bestimmung der Bakterienzahl wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Der Inhalt der einzelnen Wells wurde je nach angenommener Bakterienkonzentration 4-5 mal 1:10 in PBS verdünnt. Von den einzelnen Verdünnungen wurden 6 Tropfen von 10 µl auf vorgewärmte Blutagarplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wuchsen die entsprechenden Bakterienkolonien, die ausgezählt wurden. Die Auszählungen entsprachen der Anzahl der Bakterien, die nach der einstündigen Inkubation an die Endothelzellen adhärten bzw. in die Zellen invadierten. Die am Photometer ermittelten Konzentrationen mussten nun anhand der Kontrollwerte korrigiert werden. Die Anzahl der ausplattierten Bakterien aus den Kontrollwells liessen eine Aussage darüber zu, welche Bakterienkonzentrationen man wirklich vor der einstündigen Inkubation in die Versuchswells pipettiert hatte. Die so herausgefundenen Konzentrationen waren die eigentlichen Inokulationsdosen, mit denen die Endothelzellen inkubiert wurden. Die Ergebnisse der anderen Wells liessen sich am besten darstellen, indem man in Prozent der Inokulationsdosis (IOD) verglich. Es wurde dazu am Versuchsende des Assays ermittelt, wie viele Bakterien sich in den Wells befanden und diese Werte wurden in Verhältnis zu der IOD der Kontrollwells ausgedrückt.

### 3.7. Durchflußzytometrieanalyse (FACS Analyse) der Oberflächenmoleküle

Mit Hilfe der quantitativen Durchflußzytometrie wurden Veränderungen im Oberflächenmarkerprofil der Endothelzellen, die im Rahmen einer Aktivierung der Endothelzellen entstehen, gemessen. Wir haben dazu die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD 54) und VCAM-1 (CD 106) bestimmt. Das Experiment umfasste zwei Versuchstage. Am ersten Versuchstag wurde die Infektion der Endothelzellen, wie im Infektionsassay beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurden konfluente Monolayer in der 12-Well-Zellkulturplatte verwendet. Auf 6 Wells wurden die Endothelzellen auf die mit Gelatine beschichteten Wells ausgesät und auf den anderen 6 wurden die Zellen auf Fibrinogen kultiviert, so dass wieder die beiden unterschiedlichen Matrices miteinander verglichen werden konnten. Im ersten Versuchsteil wurde wie beschrieben ein Infektionsassay durchgeführt. Es wurden *S. sanguis* und *S. epidermidis* in der Konzentration  $5 \times 10^7$ , *S. aureus* in den Konzentrationen  $1 \times 10^7$  verwendet. Auf die geringere Konzentration der Keime wurde verzichtet. Vorausgegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass es bei einer stattgehabten Infektion der Endothelzelle immer zur Aktivierung derselben kommt, unabhängig von der Bakterieninfektionsdosis (Veltrop et al. 2000). Als negative Kontrolle wurden uninfizierte Endothelzellen verwendet. Als positive Kontrolle wurden Zellen nach Stimulation mit 5 U/ml Interleukin-1 (IL-1) verwendet. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde jedes der Wells gewaschen und mit neuem Medium (M199 plus 10 % Humanserum) versehen, um eine weitere Vermehrung der Bakterien zu vermeiden. Die Zellen blieben dann für weitere 23 Stunden im Brutschrank. Die Platte wurde nach insgesamt 24 Stunden Inkubationszeit mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 0,2 % Kollagenase bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig durch Resuspension von der Matrix gelöst und in PBS+10% FCS aufgefangen und danach für 15 Minuten in PBS+1%FCS+NGS geblockt. Dieser und alle weiteren sich anschließenden Vorgänge wurden auf Eis ausgeführt. Nach der Blockphase wurden die Zellen auf die FACS-Röhrchen verteilt, die beiden Kontroll-Wells auf vier Röhrchen, alle anderen Konditionen auf jeweils drei Röhrchen. Von den beiden primären Antikörper (Maus-Antikörper, mAb) gegen die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (anti-CD54 mAb 15.2) und VCAM-1 (anti-CD106 mAb 1G11B1) wurden je 50µl (Konzentration 1µg/ml) in eines der FACS-Röhrchen gegeben, so dass pro Kondition inklusive Kontrolle je ein Röhrchen mit ICAM - AK und eines mit VCAM – AK versehen war. Die primären Antikörper mussten anschließend 30 min auf Eis inkubiert werden. Im nächsten Schritt schloss sich dann die Markierung mit

dem sekundären, fluoreszenzhaltigen Antikörper Phycoerythrin (PE, goat-anti-mouse Ig) an. Der sekundäre Antikörper sollte an an die zuvor zugegebenen primären Antikörper binden. Von diesem wurden ebenfalls je 50µl in die mit ICAM-1 und VCAM-1 inkubierten Röhrchen gegeben, sowie in je ein Röhrchen pro Kondition inklusive Kontrolle und erneut für 30 min auf Eis inkubiert. Die Röhrchen wurden nun mit Aluminiumfolie abgedeckt. In die beiden übrigen Röhrchen der Kontroll-Wells wurde eine äquivalente Menge PBS gegeben. Nach der Markierung der Antikörper wurde die Messung mit dem Durchflusszytometer gestartet. Es wurde quantitativ die Menge an fluoreszierendem sekundären Antikörper gemessen, welche einen Rückschluss auf die Expression der zu messenden Adhäsionsmoleküle zuließ.

### 3.8. Analyse der Zytokinproduktion mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Die Mediumüberstände der auf den verschiedenen Matrices kultivierten Endothelzellen nach Bakterieninfektion wurden auf die Produktion von Zytokinen mit Hilfe des ELISA getestet. Ausgewertet wurden die Überstände nach Infektion mit *S. aureus* in Konzentration  $1 \times 10^7$  und *S. sanguis* und *S. epidermidis* in Konzentration  $5 \times 10^7$ . Im Rahmen des ELISA-Tests wurde die spezifische Erkennungsreaktion zwischen Antigen und Antikörper detektiert. Diese Reaktion wurde mittels einer enzymgesteuerten Farbreaktion sichtbar gemacht. Zur Detektion von IL-8 verwendeten wir das PeliKine Compact™ human IL-8 enzyme-linked-immunosorbent Assay Kit, zur Detektion von IL-6 und humanem MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) das Cytoset™ Immunoassay Kit. Die Tests wurden nach den Herstellerinformationen bearbeitet. Hierzu wurden die 96 Wellplatten aus dem Kit entsprechend vorbereitet durch mit einem spezifischen Antikörper gegen die getesteten Zytokine beschichtet. Nach Zugabe der zu untersuchenden Überstände in drei Verdünnungen wurde jedem Well ein entsprechend spezifischer Biotin-konjugierter, polyklonaler Antikörper zugegeben. Im nächsten Schritt wurde jedes Well mit Avidin, welches an Horseradish Peroxidase (HRP) konjugiert ist, inkubiert. Darauf wurde ein TMB (3,3',5, 5' tetramethyl-benzidine) Substrat jedem Well beigegeben. Zwischen allen Schritten des Experiments wurde ein Waschvorgang ausgeführt. Nur diejenigen Wells, die IL-8 (IL-6 oder MCP-1)-Biotin-konjugierten Antikörper und Enzym-konjugiertes Avidin enthalten, zeigten eine Farbreaktion. Die Enzym-Substrat Reaktion wurde

mit einer Schwefellösung ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N) gestoppt. Mittels Untersuchung im Spektrometer wurde die Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Anhand einer Standardkurve konnte von den Farbreaktionen auf die Konzentration der untersuchten Verdünnungen der Überstände geschlossen werden. Die eigentliche Zytokinkonzentration in den Überständen wurde anschließend berechnet. Die Detektionsgrenzen der Zytokine betragen hierbei 8,0 pg/ml für IL-8, 50,0 pg/ml für IL-6 und 30,0 pg/ml für MCP-1.

### 3.9. Monozytenadhäsion

Die im Experiment verwendete Monozytenanzahl betrug  $1,5 \times 10^5$  Monozyten pro 24-Well mit  $2 \times 10^5$  ECs. Die Monozyten (THP-1) wurden in einer Neubauer-Kammer nach vorheriger Färbung mit Türk'scher Lösung entsprechend gezählt. Die Monozyten wurden in M199 resuspendiert und mit BCECF (siehe Materialliste) für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  (6,25 ml BCECF auf 10 ml Medium) inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschvorgang mit M199 wurden die Monozyten in M199 + 10% HuSei resuspendiert. Die gefärbten Monocyten wurden auf die infizierten Endothelzellmonolayer auf den verschiedenen Matrices gegeben. Die Experimente wurden mit einer Inkubationszeit der Monozyten von 1 h und 6 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5% $\text{CO}_2$  ausgeführt. Nach einer Stunde Inkubationszeit war der Zeitpunkt erreicht, an dem man optimal die Frühreaktion der Endothelzellaktivierung nach Monozytenadhäsion messen konnte (Beekhuizen et al. 1990; Beekhuizen et al. 1997). Nach 6 Stunden Inkubationszeit konnte die prokoagulante Aktivität via Tissue Faktor (TF) ermittelt werden (Veltrop et al. 2001). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Endothelzellayer fünffach mit angewärmtem PBS gewaschen. So konnten nicht adhärenente Monozyten entfernt werden. Nach Fixierung mit Methanol für 15 Minuten wurde die Menge der adhärenenten Monozyten im Photometer (Tecan Infinite M200 Photometer) bestimmt. Die Monozytenanzahl wurde anhand einer vorher ermittelten Standardkurve bestimmt.

### 3.10. Bestimmung der prokoagulanten Aktivität

Die Gerinnungsaktivität wurde an Hand der Menge an freigesetztem Gewebethromboplastin oder Tissue Faktor (TF) gemessen. TF leitete die Bildung von FXa aus FX ein, wie zuvor beschrieben. Diese Umwandlung wurde im

Versuch gemessen. Hierzu wurden die auf unterschiedlichen Matrices kultivierten und mit den drei verschiedenen Bakterien infizierten Endothelzellen zunächst fünffach mit PBS gewaschen. Das Reaktionsgemisch, bestehend aus 15µl FVII, 12,5µl 0,1M CaCl<sub>2</sub> und 100µl Puffer A (pH7,45) wurde zu den Versuchswells auf den infizierten Endothelzelllayer dazu gegeben. Die Wellplatte wurde für 20 Minuten bei 37°C auf der Rotationsplatte bei 200rpm inkubiert. In dieser Zeit formte sich der Komplex aus TF, FVII und Calcium, in dem FVII zu FVIIa aktiviert wurde. Anschliessend wurde zu den Wells 20µl 10U/ml FX zugegeben, welches von den vorhandenen Gerinnungsfaktoren zu FXa aktiviert wurde. Eine Inkubationsphase von 5 Minuten bei 37°C und 200rpm auf der Rotationsplatte schloss sich an. Um den Vorgang der FXa-Bildung zeitlich zu stoppen, wurde 100µl Puffer B (pH 8,2) verwendet. Hierzu wurde von jedem Versuchswell 100µl Überstand in ein mit 100µl Puffer B gefülltes Röhrchen auf Eis gegeben. Die Röhrchen wurden bei 37°C ins Wasserbad gestellt, der pH-Wert durch Zugabe von 100µl Puffer C (pH 7,45) ausgeglichen.

Pro Röhrchen erfolgte nun die Zugabe des Färbemittels PefachromeFXa (1mg/ml), ein chromogenes Substrat von FXa. 25µl hiervon wurden pro Röhrchen addiert und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies führte zu einer Gelbfärbung von FXa.. Die Färbung wurde mit Zugabe von 200µl Essigsäure (50% vol/vol) gestoppt. 200 µl der Proben wurden jeweils in ein Well einer 96 Wellplatte gegeben und die IOD bei 405 nm im Photometer ermittelt. Aus der IOD wurden die FXa Konzentrationen berechnet. Hierzu wurde eine Standardkurve mit reinem FX erstellt, der mit Russel Viper Venom vollständig aktiviert war. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in die Menge an gebildetem FXa in mU FXa pro Well mit  $2 \times 10^5$  ECs umgerechnet. Hierzu verwendeten wir folgende Formel:

$$\text{FXa} = (0,2156 \times [\text{OD}405\text{-background plate}] - 0,0021) \times 1000.$$

### 3.11. Statistische Analyse

Die vorliegenden Daten wurden mit dem PASW-Programm von Windows software, Version 18 (SPSS GmbH Software, München), analysiert. Die Daten waren normalverteilt und wurden mit dem einfaktoriellem ANOVA-Test (ANalysis Of VAriance) analysiert. Die Methode nach Scheffé wurde verwendet, um die Signifikanzniveaus für multiple Vergleiche zu korrigieren. Die Ergebnisse wurden in Mittelwert  $\pm$  Standardfehler vom Mittelwert angegeben. Als signifikant galten Werte mit  $p \leq 0,05$ .

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bestimmung der Zellkerndichte mittels DAPI-Färbung

Die Färbung der Endothelzellen mit DAPI gab die Dichte des Endothelzelllayers, d. h. die Anzahl der Zellen pro Fläche, auf den unterschiedlichen Matrices wieder. Hiermit wurde untersucht, ob die Zellen sich in Wachstum und Kultur, unabhängig von der Matrix, auf der sie angesiedelt sind, gleich verhalten. Es wurden dabei die Anzahl der Zellkerne pro Fläche gezählt und so auf die Zellzahl/Fläche geschlossen. In Tabelle 1 sind die Mittelwerte der Zellzahlen pro Quadratzentimeter aufgeführt.

	Polystyren	Fibringel	Kollagengel
Mittelwert (Zellen/cm <sup>2</sup> )	1,02 x 10 <sup>5</sup>	1,14 x 10 <sup>5</sup>	1,04 x 10 <sup>5</sup>

Tabelle 1: Zellzahl / Fläche

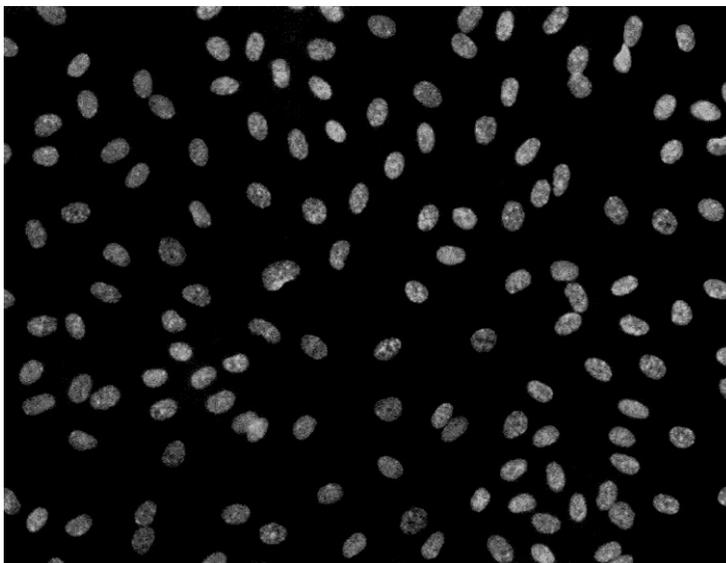


Abb. 3: Zelllayer nach Färbung der Zellkerne mit DAPI

Vergrößerung: 100x

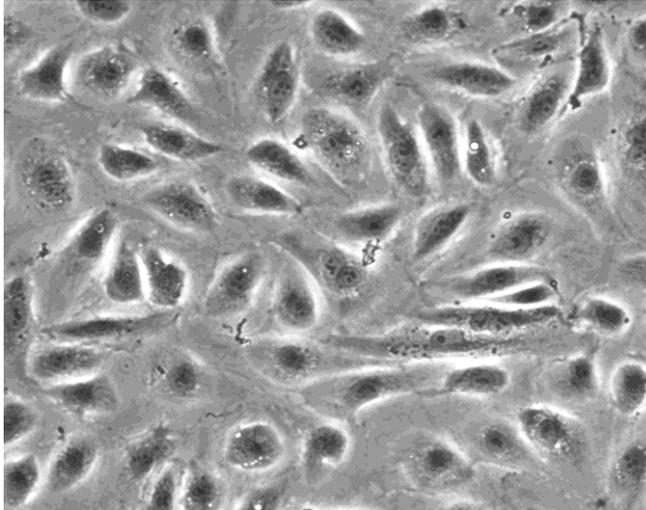


Abb. 4: Mikroskopie des Endothelzelllayers  
Vergrößerung: 100x

Abbildung 4 zeigt ein mikroskopisches Bild eines intakten EC-Monolayers, Abbildung 3 den Zelllayer nach Färbung der Zellkerne mit DAPI.

Vergleicht man die Anzahl der Zellen pro Quadratcentimeter auf den unterschiedlichen Matrices (Tabelle 1) miteinander, ist zu sehen, dass die Zellzahlen nicht signifikant voneinander abweichen. Der Zellmonolayer hatte die gleiche Zelldichte auf allen drei Oberflächen. Damit waren die gleichen Ausgangsbedingungen für die weiteren Experimente gegeben.

## 4.2. Infektionsassay

### 4.2.1. Bakterienadhäsion an Matrices ohne Endothelzellen

Um das Adhäsionsvermögen der Matrices (Polystyren, Fibringel und Kollagengel) selbst zu untersuchen infizierten wir die Matrices mit Bakterien ohne vorherige Endothelzellbesiedlung. Die Anzahl der adhärenenten Bakterien wurde in Prozent der Inokulationsdosis ausgedrückt. Die Ergebnisse sind der nachstehenden Tabelle (Tabelle 2) zu entnehmen. Die Adhäsion der Bakterien *S. sanguis* und *S. epidermidis* waren auf allen Matrices vergleichbar. Auch nach Ausbringen auf die Gelmatrices waren keine signifikanten Steigerungen der Adhäsionsfähigkeit zu verzeichnen. *S. aureus* dagegen zeigte einen deutlichen Anstieg der Adhäsion nach Inkubation auf beiden Gelmatrices gegenüber Polystyren. Auf Kollagengel

erhöhte sich der Wert um das Zehnfache, auf Fibringel versiebzehnfachte sich die Adhäsionskapazität.

	<b>Polystyren</b> (MEAN ± SEM)	<b>Fibringel</b> (MEAN ± SEM)	<b>Kollagengel</b> (MEAN ± SEM)
<b><i>S. aureus</i></b>	0,31 (± 0,08)	5,51 (± 0,38) **	3,32 (± 0,92)**
<b><i>S. sanguis</i></b>	0,05 (± 0,02)	0,05 (± 0,02)	0,14 (± 0,05)
<b><i>S. epidermidis</i></b>	0,26 (± 0,03)	0,24 (± 0,04)	0,32 (± ,02)

Tabelle 2: Bakterienadhäsion an den Matrices ohne Endothelzellen

ANOVA Analyse: \*\* =  $p < 0,01$  Gel Matrices im Vergleich zur Kondition auf der Polystyrenplatte  
Angaben in % der Inokulationsdosis, MEAN = Mittelwert, SEM = Standardfehler des Mittelwertes

#### 4.2.2. Bakterielle Infektion der Endothelzellen

Um die Adhäsion der Bakterien an ECs zu untersuchen, wurden die Bakterien *S. aureus*, *S. sanguis* und *S. epidermidis* in zwei verschiedenen Konzentrationen für 1 Stunde mit den ECs inkubiert. Die ECs wurden zuvor auf den drei Matrices zu einem konfluenten Monolayer kultiviert. Abbildung 5 zeigt die Bakterienadhäsion und –invasion, angegeben in % der Inokulationsdosis (IOD), auf den drei Matrices.

## Bakterienadhäsion an Endothelzellen – kultiviert auf unterschiedlichen Matrices

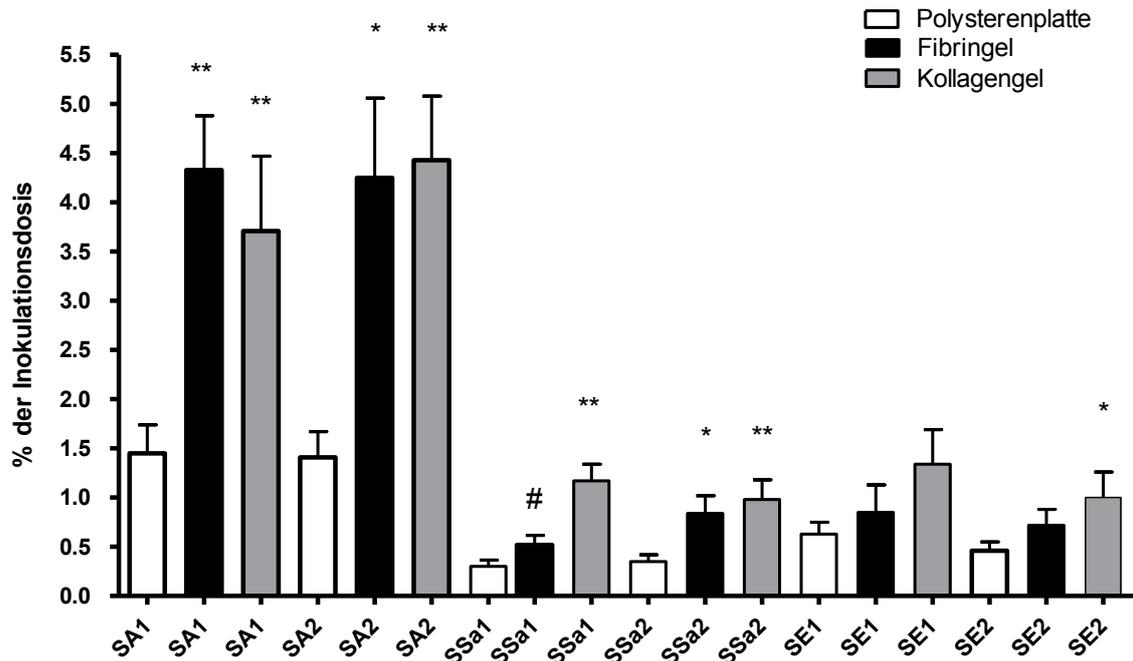


Abb. 5: Bakterienadhäsion von ECs, kultiviert auf unterschiedlichen Matrices

Die Endothelzellmonolayer auf den Matrices wurden für 1 Stunde mit *S. aureus* (K1:  $1 \times 10^6$ , K2:  $1 \times 10^7$ ), *S. sanguis* und *S. epidermidis* (jeweils K1:  $5 \times 10^6$ , K2:  $5 \times 10^7$ ) inkubiert. Die nach der Inkubation adhärennten Bakterien wurden nach Waschung und anschließender Lyse der Endothelzellen verdünnt, auf Blutagar ausplattiert und so die Anzahl der adhärennten Bakterien bestimmt.

Gezeigt sind die Ergebnisse von 10 repräsentativen Versuchen.

SSa: *S. sanguis* 1: Konzentration 1

SE: *S. epidermidis* 2: Konzentration 2

SA: *S. aureus*

\*  $p < 0,05$  Gelmatrix vs. Polystyren

\*\*  $p < 0,01$  Gelmatrix vs. Polystyren

#  $p < 0,05$  Fibringelmatrix vs. Kollagengelmatrix

### Untersuchung der bakteriellen Infektion in Abhängigkeit von den verschiedenen Bakterienstämmen

Verglich man die Infektionsrate der drei untersuchten Bakterien, so zeigte sich, dass *S. aureus* die höchste Kapazität besaß, ECs zu infizieren (max. 5% der Inokulationsdosis). *S. sanguis* und *S. epidermidis* zeigten mit Werten zwischen 0,5 – 1,5% der IOD eine deutlich geringere Fähigkeit, an Endothelzellen zu binden

und zu invadieren. In den Versuchen wurden für die Keime *S. sanguis* und *S. epidermidis* daher höhere Konzentrationen verwendet als für *S. aureus*. So konnte eine maximal hohe Infektionsrate bei noch intaktem Endothelzelllayer erreicht werden. Das Bakterienwachstum während der Infektionsperiode war vernachlässigbar klein (Daten hier nicht gezeigt). Wir verwendeten *S. aureus* in den Konzentrationen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$ , für *S. sanguis* und *S. epidermidis* jeweils die Infektionsdosen von  $5 \times 10^6$  und  $5 \times 10^7$  pro  $2 \times 10^5$  ECs.

Im Detail zeigte *S. aureus* ohne Ausnahme in beiden Konzentrationen (K1, K2) auf allen drei Matrices eine signifikant höhere Infektionsrate als *S. sanguis* oder *S. epidermidis* an ECs auf der gleichen Matrix.

Die berechneten Signifikanzen stellten sich als folgt dar: Vergleich *S. aureus* zu *S. sanguis*: Polyester K1:  $p < 0,01$ , K2:  $p < 0,01$ ; Fibringel K1:  $p < 0,01$ , K2:  $p < 0,05$ ; Kollagengel K1:  $p < 0,05$ , K2:  $p < 0,01$  sowie

Vergleich *S. aureus* und *S. epidermidis*: Polyester K1:  $p < 0,05$ , K2:  $p < 0,05$ ; Fibringel K1:  $p < 0,01$ , K2:  $p < 0,05$ ; Kollagengel K1:  $p < 0,01$ , K2:  $p < 0,01$ .

Somit hatte *S. aureus*, im Vergleich zu *S. sanguis* und *S. epidermidis*, eine signifikant höhere Adhäsions- und Invasionskapazität.

### **Untersuchung der bakteriellen Infektion in Abhängigkeit von den verschiedenen Matrices**

Die Ergebnisse zeigten, dass die Infektionsrate aller drei Bakterien auf Fibrin- und Kollagengel höher war als auf Polyester.

Verglich man die Werte einzeln miteinander, so ergaben sich folgende signifikante Unterschiede: *S. sanguis*: Kollagengel K1, K2  $p < 0,01$ , Fibringel K2  $p < 0,05$ ; *S. epidermidis*: Kollagengel K2  $p < 0,05$ ; *S. aureus*: Kollagengel K1, K2  $p < 0,01$ , Fibringel K1  $p < 0,01$ , K2  $p < 0,05$ .

Die oben beschriebenen Werte legten dar, dass, unabhängig von der Bakterienspezies, die Infektion der ECs, die auf Fibrin- oder Kollagengel kultiviert waren, höher war als die Infektion der Zellen, die auf Polyester kultiviert wurden.

### **Vergleich der beiden Gelmatrices zueinander**

Die Werte der Infektion auf Fibrin- und Kollagengel (bei gleicher Bakterienspezies und gleicher Konzentration) zeigten abgesehen von *S. sanguis* in Konzentration 1 ( $p < 0,05$ ) keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Matrices.

Es gab also keinen statistisch relevanten Unterschied bezüglich der Infektionsrate von ECs auf Fibrin- oder Kollagengel als Matrix, unabhängig von der Bakterienspezies.

Die Infektionsrate der Bakterien *S. sanguis* und *S. epidermidis* war auf Kollagen- und Fibringel höher als auf Polysteren. Es gab einen tendenziell deutlicheren Unterschied zwischen Kollagengel und Polysteren im Gegensatz zu Fibringel und Polysteren. Bezüglich der Adhäsion von *S. aureus* liess sich dieses Muster nicht wiederfinden. Die Adhäsion von *S. aureus* war, wie oben beschrieben, sowohl auf Fibrin- als auch auf Kollagengel für beide Konzentrationen höher als auf Polysteren.

**Fazit:**

*S. aureus* zeigte deutlich höhere Infektionsraten als *S. sanguis* und *S. epidermidis* bezüglich ECs auf allen drei Matrices. Die Infektionsrate auf den beiden Gelmatrices war für alle Bakterien höher als auf Polysteren. Die „Infektionskapazität“ aller drei Bakterien auf den beiden Gelmatrices unterschied sich nicht voneinander.

#### 4.3. Proinflammatorische Aktivierung der auf den Matrices kultivierten Endothelzellen

Im Rahmen der vorangegangenen Versuche konnte gezeigt werden, dass die jeweils gewählten Konzentrationen 1 und 2 sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Beide Konzentrationen der Bakterien führten zu einer relevanten Infektion und im Weiteren zur Aktivierung der ECs. In den nachfolgend dargestellten Versuchen werden daher pro Bakterium jeweils nur die Ergebnisse einer Konzentration aufgezeigt. Des Weiteren wurden in dem vorausgegangenen Versuch in der Ergebnisanalyse sowohl die Bakterien untereinander als auch die verschiedenen Matrices zueinander verglichen. Voruntersuchungen (Veltrop et al. 1999) auf Polysteren haben vergleichbare Ergebnisse für den Vergleich der Bakterien untereinander gezeigt.

In unserer Arbeit sollte insbesondere der Einfluss der Matrix auf den Infektionsprozess untersucht werden. Da die Ergebnisse für den Vergleich der Bakterien untereinander nicht von Voruntersuchungen abwichen, konzentrierten wir uns in den folgenden Versuchen hauptsächlich auf den Vergleich der Matrices untereinander.

#### 4.3.1. Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen

Nicht infizierte ECs auf den drei Matrices wurden auf die Expression von  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin untersucht. Die Ergebnisse wichen nicht signifikant voneinander ab. Auf Fibringel fand sich ein Mittelwert von  $193,4 \pm 26,9$ , auf Kollagengel  $260,1 \pm 29,1$  und auf Polysteren  $206,3 \pm 32,7$ .

Als Marker der proinflammatorischen Aktivierung der ECs wurde die endotheliale Expression von ICAM-1 (CD 54) und VCAM-1 (CD 106) mit Hilfe der quantitativen Durchflußzytometrie (FACS Analyse) gemessen. Es wurde untersucht, ob die Infektion der ECs einen Einfluss auf deren Aktivierung hatte und welche Rolle die Matrices, auf denen die ECs kultiviert wurden, im Rahmen der Endothelzellaktivierung spielten. Als positive Kontrolle dienten Endothelzellen, die mit IL-1 $\alpha$  (5 U/ml) stimuliert wurden. Verglichen wurden jeweils Endothelzellen auf Fibringel, Kollagengel und Polysteren, die mit den Keimen *S. aureus*, *S. sanguis* und *S. epidermidis* oder IL-1 stimuliert wurden. Die Monolayer von  $2 \times 10^5$  ECs auf den verschiedenen Matrices wurden für 1h mit  $1 \times 10^7$  *S. aureus*,  $5 \times 10^7$  *S. sanguis* und *S. epidermidis* inkubiert. Danach wurde der Zelllayer gewaschen und die nicht adhärenen Bakterien entfernt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 23 h wurde die FACS-Analyse ausgeführt.

##### **ICAM-1 Expression der Endothelzellen**

Abbildung 6 zeigt die endotheliale Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1. Die Ergebnisse werden als Vielfaches der ICAM-1 Expression von unstimulierten Endothelzellen angegeben. Der Expression unstimulierter Zellen wird der Wert 1 zugeordnet.

## ICAM-Expression – infizierte ECs auf den unterschiedlichen Matrices

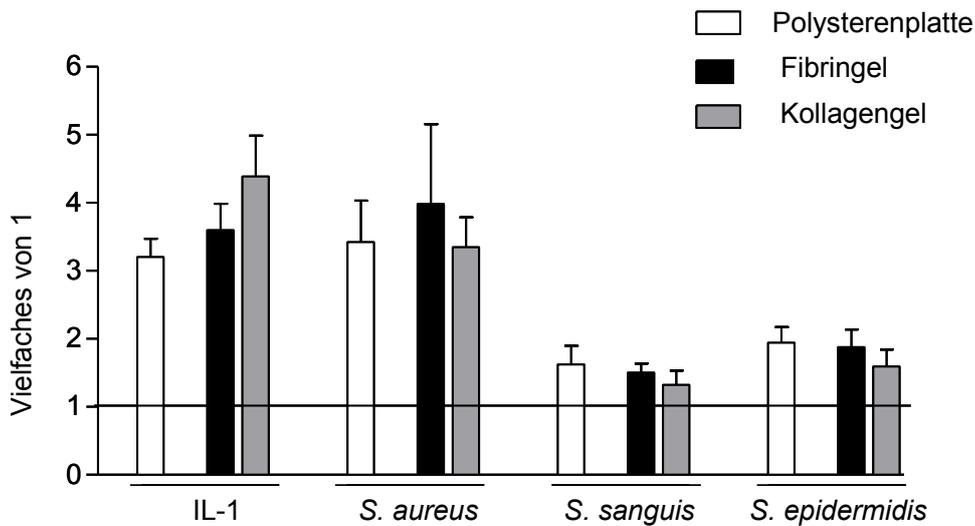


Abb. 6: Durchflusszytometrieanalyse der endothelialen Expression von ICAM-1 nach bakterieller Infektion

Die Endothelzellmonolayer auf den Matrices wurden für 1 Stunde mit *S. aureus* ( $1 \times 10^7$ ), *S. sanguis* und *S. epidermidis* (jeweils  $5 \times 10^7$ ) inkubiert und nach Waschung für weitere 23 Stunden kultiviert. Nach Fluoreszenzmarkierung der Antikörper gegen ICAM-1 wurde die Durchflusszytometrie vorgenommen. Die Ergebnisse werden als Vielfaches der ICAM-1-Expression von unstimulierten Zellen angegeben.

Gezeigt sind die Ergebnisse von 10 repräsentativen Versuchen.

IL-1: Interleukin-1

Die oben stehende Grafik zeigt ein ähnliches Verhalten hinsichtlich der ICAM-Expression bei IL-1-stimulierten Zellen und jenen, die mit *S. aureus* inkubiert wurden. Stimulation der ECs mit IL-1 und *S. aureus* führte zu einer 3,5 bis 4-fachen Steigerung der ICAM-1 Expression im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Infektion mit *S. sanguis* oder *S. epidermidis* rief eine geringere ICAM-1 Expression hervor.

Die ICAM-1 Werte nach IL-1-Stimulation und *S. aureus* Infektion waren nicht statistisch signifikant unterschiedlich, unabhängig von der Matrix. Vergleicht man die Werte für *S. sanguis* und *S. epidermidis* miteinander, so liess sich auch hier kein Unterschied mit statistischer Relevanz nachweisen.

Die ICAM-1 Expression nach Stimulation mit IL-1 oder Infektion mit *S. aureus* war jedoch signifikant höher als die nach Infektion von ECs mit *S. sanguis* und *S. epidermidis* auf Polysteren, Fibrin- und Kollagengel ( $p < 0,01$ , t-Test).

Verglich man aber die Werte für die ICAM-1 Expression in Abhängigkeit von der Matrix, so zeigte sich Folgendes:

Die Höhe der ICAM-1 Expression nach Stimulation mit IL-1 und nach Infektion mit *S. aureus* zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Polysteren, Fibrin- und Kollagengel untereinander.

Ebenso zeigte die ICAM-Expression nach Infektion mit *S. sanguis* oder *S. epidermidis* keinen signifikanten Unterschied zwischen Polysteren, Fibrin- und Kollagengel untereinander.

## VCAM-1 Expression der Endothelzellen

Abbildung 7 zeigt die endotheliale Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1. Die Ergebnisse werden als Vielfaches der VCAM-1 Expression von unstimulierten Endothelzellen angegeben. Der Expression unstimulierter Zellen wird der Wert 1 zugeordnet.

### VCAM-Expression – infizierte ECs auf den unterschiedlichen Matrices

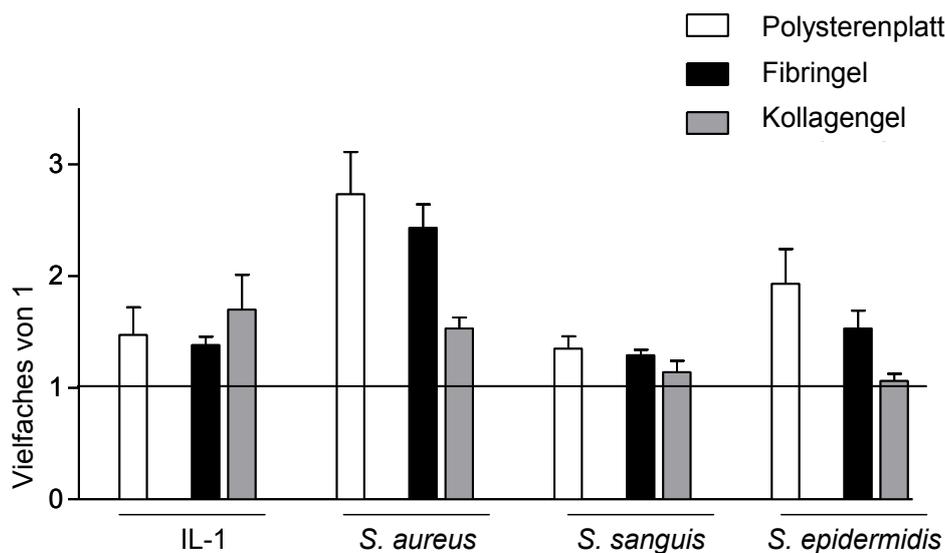


Abb. 7: Durchflusszytometrieanalyse der endothelialen Expression von VCAM-1 nach bakterieller Infektion

Die Endothelzellmonolayer auf den Matrices wurden für 1 Stunde mit *S. aureus* ( $1 \times 10^7$ ), *S. sanguis* und *S. epidermidis* (jeweils  $5 \times 10^7$ ) inkubiert und nach Waschung für weitere 23 Stunden kultiviert. Nach Fluoreszenzmarkierung der Antikörper gegen VCAM-1 wurde die Durchflusszytometrie vorgenommen. Die Ergebnisse werden als Vielfaches der VCAM-1-Expression von unstimulierten Zellen angegeben.

Gezeigt sind die Ergebnisse von 10 repräsentativen Versuchen.

IL-1: Interleukin 1

Vergleich man die Ergebnisse der einzelnen Bakterien untereinander, zeigte sich, dass die Expression der VCAM-1 Moleküle augenscheinlich nach Infektion mit *S. aureus* höher war als nach Stimulation mit IL-1 oder Infektion mit den anderen Bakterien.

Die Ergebnisse der VCAM-1 Expression nach Infektion mit *S. sanguis* und *S. epidermidis* zeigten, wie auch in der Untersuchung der ICAM-1 Expression bereits festgestellt, ähnlich hohe Werte. Auf Polystyren zeigte sich nach Infektion mit *S. epidermidis* eine höhere VCAM-1 Expression als nach Infektion mit *S. sanguis* ( $p < 0,05$ ). Bis auf diesen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Die verwendete Matrix hatte keinen Einfluss auf die endotheliale VCAM-1 Expression. Die VCAM-1 Expression auf Kollagengel als Matrix schien zwar tendenziell geringer als auf den anderen Matrices, war statistisch aber nicht signifikant kleiner.

Nach Stimulation mit IL-1 und *S. aureus* ergab sich bei dem Vergleich der Matrices untereinander keine statistische Relevanz.

Dies galt ebenfalls für die Konditionen nach Infektion mit *S. sanguis* und *S. epidermidis*, die eine vergleichbar hohe VCAM-1 Expression auf allen Matrices zeigten.

### **Fazit**

Die Stimulation der ECs mit IL-1 und *S. aureus* zeigten eine statistisch signifikant höhere ICAM-1 Expression als die Stimulation mit *S. sanguis* und *S. epidermidis*. Die Aktivierungspotenz von *S. aureus* war vergleichbar hoch wie die Stimulation mit IL-1. Die ICAM-1 Expression nach Stimulation / Infektion war unabhängig von der Matrix, auf der die Endothelzellen angesiedelt waren.

Bei der Expression des Oberflächenrezeptors VCAM-1 zeigte sich eine ähnliche Ergebnisverteilung wie bei der Expression des ICAM-1 Moleküls. Es ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Stimulation mit IL-1 und der Infektion mit *S. aureus* im Vergleich zu der Infektion mit *S. sanguis* und *S. epidermidis*. Darüber hinaus war die VCAM-1 Expression nach Infektion der ECs mit *S. aureus*, wenn auch statistisch nicht relevant, höher als die Expression nach Stimulation mit IL-1. Die Aktivierungspotenz von *S. aureus* war erneut vergleichbar hoch wie die Stimulation mit IL-1.

Die VCAM-1- Expression nach Stimulation / Infektion war unabhängig von der Matrix, auf der die Endothelzellen angesiedelt waren.

#### 4.3.2 Endotheliale Zytokinproduktion nach bakterieller Infektion

Abbildung 8 zeigt die endotheliale Produktion von IL-8, IL-6 und MCP-1 nach bakterieller Infektion oder Stimulation mit IL-1 der ECs auf den unterschiedlichen Matrices.

Monolayer von  $2 \times 10^5$  Zellen wurden auf den verschiedenen Matrices kultiviert. In den Überständen wurde nach Infektion mit  $1 \times 10^7$  *S. aureus*,  $5 \times 10^7$  *S. sanguis* und *S. epidermidis* die Konzentration der Zytokine gemessen. Die Daten sind angegeben in Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. „EC Kontrolle“ zeigt die Werte der basalen Zytokinproduktion bei uninfizierten Zellen.

## Endotheliale Zytokinproduktion nach bakterieller Stimulation

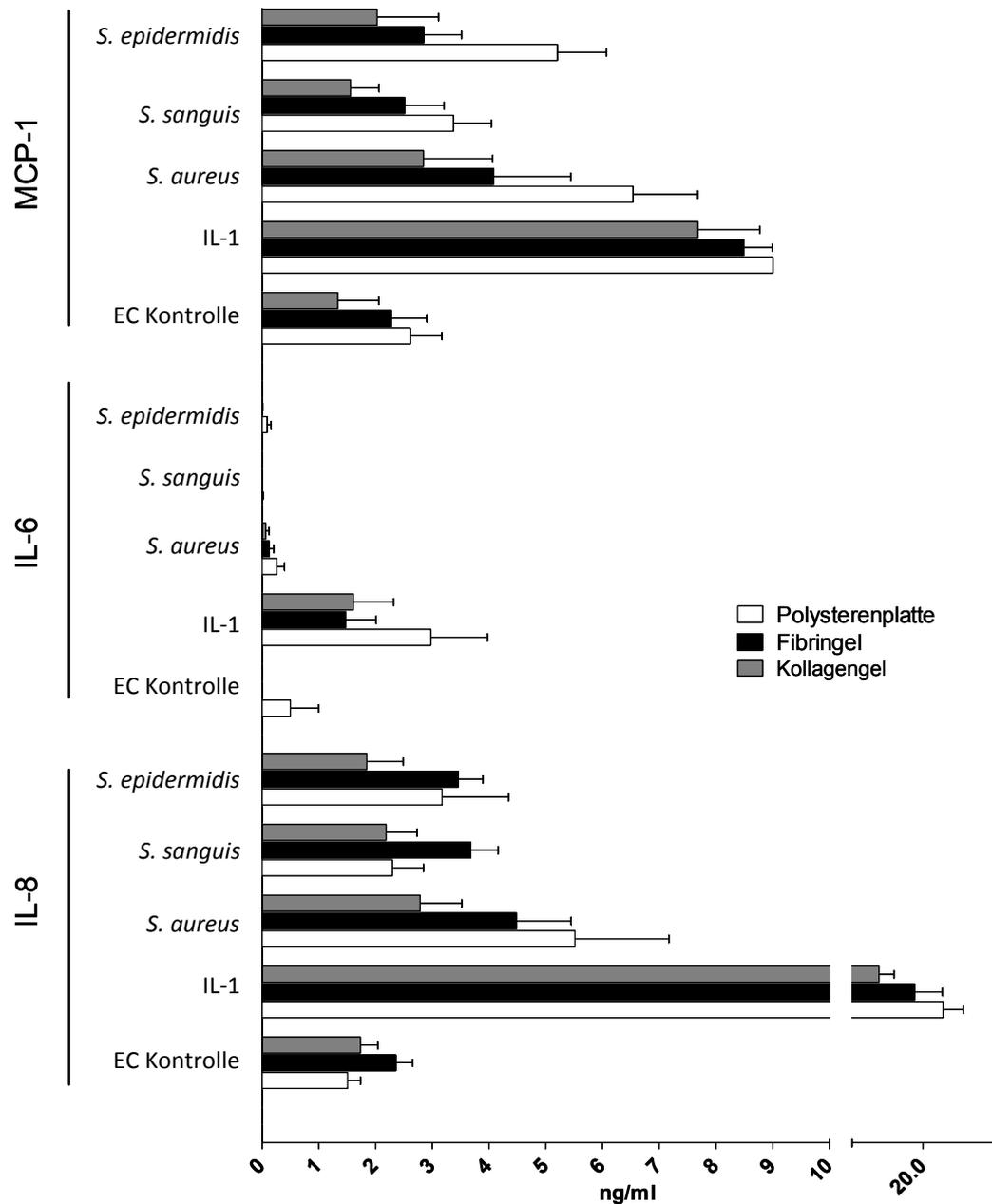


Abb. 8: Endotheliale Produktion von IL-8, IL-6 und MCP-1 nach bakterieller Infektion

Die Endothelzellmonolayer auf den Matrices wurden für 1 Stunde mit *S. aureus* ( $1 \times 10^7$ ), *S. sanguis* und *S. epidermidis* (jeweils  $5 \times 10^7$ ) inkubiert und nach Waschung für weitere 23 Stunden kultiviert. Die Konzentration der Zytokine im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. „EC Kontrolle“ zeigt die Werte der basalen Zytokinproduktion bei uninfizierten Zellen.

Gezeigt sind die Ergebnisse von 10 repräsentativen Versuchen.

### **Uninfizierte Zellen**

Nicht infizierte ECs (Monolayer von  $2 \times 10^5$  ECs) sezernierten geringe Mengen von MCP-1 (1,33 – 2,61ng/ml) und IL-8 (1,73 – 2,35 ng/ml). Die Menge an sezerniertem IL-6 war vernachlässigbar klein, wie in Abbildung 8 dargestellt.

### **Stimulation mit IL-1**

Die Produktion von MCP-1 und IL-8 im Zellüberstand war nach Stimulation durch IL-1 signifikant erhöht im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ( $p < 0,01$ , ANOVA-Analyse), unabhängig von der Matrix. Die Produktion von IL-6 schien nach Stimulation mit IL-1 auf Fibringel oder Kollagengel als Matrix geringer als auf Polyester, hier liess sich aber keine statistische Signifikanz nachweisen.

### **Infizierte Zellen**

Nach Infektion der Zellen mit *S. aureus* ergab sich eine erhöhte Produktion der Zytokine IL-8 und MCP-1 auf allen drei Matrices, auch nach Infektion mit *S. sanguis* und *S. epidermidis* war die Zytokinproduktion erhöht, wenn auch weniger ausgeprägt. Die Produktion von IL-6 war nach Infektion der ECs mit allen drei Bakterien vernachlässigbar gering. Ein signifikanter Unterschied der Zytokinproduktion auf den drei unterschiedlichen Matrices liess sich nach Bakterieninfektion nicht nachweisen.

## 4.4. Adhäsion von Monozyten

Nach 24-stündiger Inkubation der EC-Monolayer mit den drei Bakterien ( $1 \times 10^7$  *S. aureus*,  $5 \times 10^7$  *S. sanguis* und *S. epidermidis*) wurden die Zellen gewaschen und auf allen drei Matrices in Kokultur mit den Monozyten gebracht. Als positive Kontrolle wurden die ECs mit 5 ng/ml IL-1 stimuliert. Unstimulierte Endothelzellen dienten als negative Kontrolle („EC-Kontrolle“). Die Anzahl der adhärenenten Monozyten wurde nach 6 Stunden Kokultur gemessen.

## Monozytenadhäsion auf Endothelzellen

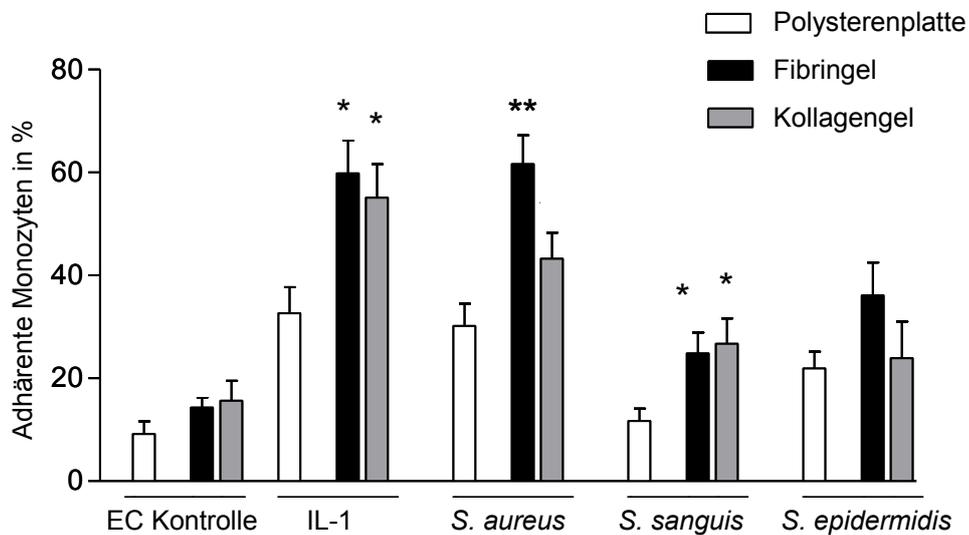


Abb. 9: Monozytenadhäsion auf Endothelzellen nach bakterieller Infektion

Die Endothelzellmonolayer auf den Matrices wurden für 1 Stunde mit *S. aureus* ( $1 \times 10^7$ ), *S. sanguis* und *S. epidermidis* (jeweils  $5 \times 10^7$ ) inkubiert und nach Waschung für weitere 23 Stunden kultiviert und anschließend in Kokultur mit den Monozyten gebracht.

Als positive Kontrolle wurden die ECs mit 5 ng/ml IL-1 stimuliert. Unstimulierte Endothelzellen dienen als negative Kontrolle („EC-Kontrolle“). Die Anzahl der adhärenen Monozyten wurde nach 6 Stunden Kokultur gemessen.

Gezeigt sind die Ergebnisse von 10 repräsentativen Versuchen.

\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$  Gelmatrices verglichen mit Polystyrenmatrix, ANOVA

Es zeigte sich (in Abbildung 9), dass nach Infektion mit *S. aureus* die Adhäsion der Monozyten an die Endothelzellen um 30-60% gesteigert war. Durch IL-1 stimulierte Endothelzellen hatten den gleichen Anteil an adhärenen Monozyten, auch hier zeigte sich erneut, dass *S. aureus* eine hoch stimulierende Wirkung auf die inflammatorische Reaktion der Endothelzellen hatte, wie schon in den vorhergehenden Versuchen angenommen. Verglich man die Monozytenadhäsion an die Endothelzellen in Abhängigkeit der Matrices, so zeigte sich, dass die

Adhäsion an Zellen auf den Gelmatrices signifikant höher war als auf Polysteren nach Stimulation mit *S. aureus*, *S. sanguis* und IL-1 ( $p < 0,01$ ). Nach Infektion mit *S. epidermidis* oder ohne Stimulation ergab sich kein Unterschied in der Monozytenadhäsion zwischen den Matrices.

### **Fazit**

Die Adhäsion der Monozyten an die Endothelzellen war nach Stimulation mit IL-1 sowie nach Infektion mit *S. aureus* gesteigert. Die Ergebnisse für *S. aureus* lagen im gleichen Bereich wie die für IL-1, wohingegen die Ergebnisse für die Monozytenadhäsion nach Infektion mit *S. sanguis* und *S. epidermidis* miteinander vergleichbar waren.

Verglich man die Matrices zueinander, ergab sich auf den beiden Gelmatrices eine signifikant gesteigerte Menge an adhärenenten Monozyten an ECs als auf Polysteren. Diese Werte ergaben sich nach Stimulation mit IL-1 und Infektion mit *S. aureus* und *S. sanguis*. Bei den uninfizierten Zellen sowie nach Infektion mit *S. epidermidis* liessen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Matrices aufzeigen.

#### 4.5. Prokoagulante Aktivität

Um die prokoagulante Aktivität zu bestimmen, massen wir die biologische Aktivität von Gewebethromboplastin, weiter als Tissue Faktor (TF) bezeichnet. Im Rahmen der Versuchsauswertung hat sich gezeigt, dass die Endothelzellen unterschiedlicher Donoren eine sehr große Abweichung in der Reaktion auf die verschiedenen Stimuli zeigten. Um diesen Messfehler zu eliminieren und einen adäquaten Vergleich zu ziehen, wurden stimulierte Endothelzellen zu unstimulierten Zellen des gleichen Donors verglichen. Angegeben ist die Aktivität von TF berechnet aus der gemessenen FXa-Konzentration. In der Grafik sind die Ergebnisse dargestellt als Vielfaches der Fxa-Produktion unstimulierter Zellen (unstimulierten Zellen wurde der Wert =1 zugeordnet).

Die Ergebnisse des Versuches mit den Endothelzellen allein (links in der Grafik) sind direkt mit den Ergebnissen der Endothelzellen in Kokultur mit Monozyten (rechts in der Grafik) zum besseren Vergleich dargestellt.

## Prokoagulate Aktivität – TF – abhängige Bildung von Fxa

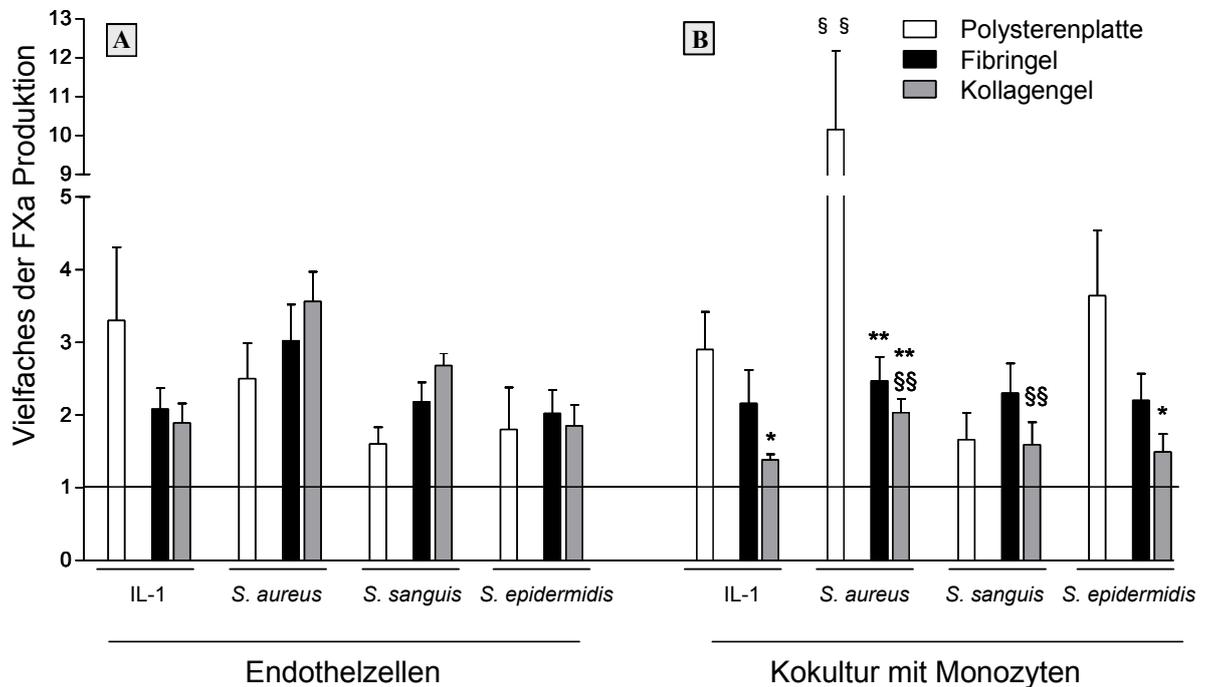


Abb. 10: Prokoagulate Aktivität - TF-abhängige Bildung von Fxa

Die Endothelzellmonolayer auf den Matrices wurden für 1 Stunde mit *S. aureus* ( $1 \times 10^7$ ), *S. sanguis* und *S. epidermidis* (jeweils  $5 \times 10^7$ ) inkubiert und nach Waschung für weitere 23 Stunden kultiviert. Als positive Kontrolle wurden die ECs mit 5 ng/ml IL-1 stimuliert. Die Endothelzellen in Figur B wurden vor der Messung für 6 Stunden in Kokultur mit Monozyten gebracht.

Angegeben ist die Aktivität von TF, berechnet aus der gemessenen FXa-Konzentration. In der Grafik sind die Ergebnisse dargestellt als Vielfaches der Fxa-Produktion unstimulierter Zellen (unstimulierten Zellen wurde der Wert =1 zugeordnet).

Gezeigt sind die Ergebnisse von 10 repräsentativen Versuchen.

\*  $p < 0,05$  Gelmatrix vs. Polystyren, \*\*  $p < 0,01$  Gelmatrix vs. Polystyren

§ §  $p < 0,01$  Kondition in Figur B vs. Kondition ohne Monozytenkokultur in Figur A

### 4.5.1. Prokoagulate Aktivierung der Endothelzellen

Nicht infizierte Endothelzellen zeigten unabhängig von der Matrix, auf der sie kultiviert wurden, wenig TF-Aktivität (Polystyren:  $2,88 \pm 0,32$ , Fibringel:  $2,84 \pm 0,42$ , Kollagengel:  $3,13 \pm 0,55$  mU FXa/ $2 \times 10^5$  Zellen; kein signifikantes Ergebnis).

Auf Polysteren zeigte sich, wie in Abbildung 10 A dargestellt, eine deutliche Zunahme der Menge an TF-Aktivität nach Infektion mit *S. aureus* oder Stimulation mit IL-1. Nach Infektion mit *S. sanguis* oder *S. epidermidis* zeigte sich ebenfalls eine Zunahme, jedoch weniger ausgeprägt. Diese Ergebnisse sind bereits in den vorangegangenen Versuchen ähnlich ausgefallen, *S. aureus* zeigte auch hier wieder eine ähnlich starke Potenz wie IL-1, die Ergebnisse für *S. sanguis* und *S. epidermidis* fielen ebenfalls zueinander ähnlich aus.

Verglich man die Matrices untereinander, so schien die TF-Aktivität nach Infektion mit den drei Bakterien auf den Gelmatrices höher zu sein als auf Polysteren. Eine statistische Signifikanz lag aber nicht vor.

#### **Fazit:**

*S. aureus* und IL-1 zeigten eine vergleichbare Potenz in der Gerinnungsaktivierung der Endothelzellen, *S. sanguis* und *S. epidermidis* zeigten eine geringere Potenz. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen liessen sich jedoch nicht erheben.

Die TF-Aktivität der ECs auf den verschiedenen Matrices unterschied sich nicht.

#### 4.5.2. Prokoagulante Aktivierung in Kokultur mit Monozyten

Nicht infizierte Endothelzellen zeigten auf den Gelmatrices bereits signifikant niedrigere Werte ( $p < 0,05$ , ANOVA-Analyse) für die TF-Aktivität in Kokultur mit Monozyten als die nicht infizierten Endothelzellen auf Polysteren (Polysteren:  $8,86 \pm 1,94$ , Fibringel:  $3,45 \pm 0,37$ , Kollagengel:  $3,92 \pm 0,56$  mU FXa/ $2 \times 10^5$  Zellen)

Auf Polysteren ergab sich in Anwesenheit der Monozyten eine deutlich gesteigerte TF-Aktivität nach Stimulation mit IL-1 und Infektion mit *S. aureus* und *S. epidermidis* als ohne Monozytenkokultur (§§,  $p < 0,01$  *S. aureus* auf Polysteren).

Nach Infektion mit *S. aureus* zeigten die Endothelzellen in Kokultur mit Monozyten auf den beiden Gelmatrices eine signifikant geringere Produktion von TF als auf Polysteren (\*\*,  $p < 0,01$  Gelmatrices zu Polysteren).

Tendentiell liess sich dies auch für die mit IL-1 stimulierten und mit *S. epidermidis* infizierten Endothelzellen sagen, aber eine statistische Relevanz ergab sich nur für *S. epidermidis* auf Kollagen (\*,  $p < 0,05$  Kollagen zu Polysteren).

Für die Endothelzellen nach Infektion mit *S. aureus* und *S. sanguis* zeigte sich in Kokultur mit Monozyten auf Kollagengel eine signifikant geringere Produktion von

TF als in Abwesenheit der Monozyten (§§,  $p < 0,01$  Gelmatrices mit und ohne Monozyten).

### **Fazit**

Auf beiden Gelmatrices war in Monozytenkokultur nach Infektion mit *S. aureus* die TF-Produktion statistisch relevant geringer als auf der Polystyrenmatrix. Es ergab sich kein Unterschied zwischen den ECs auf Fibrin- oder Kollagengel.

Auf der Polystyrenmatrix ergab sich in Monozytenkokultur nach Stimulation mit IL-1 und Infektion mit *S. aureus* und *S. epidermidis* signifikant mehr TF-Aktivität als in Abwesenheit der Monozyten. Auf der Kollagenmatrix produzierten die Endothelzellen nach Infektion mit *S. aureus* und *S. sanguis* in Anwesenheit der Monozyten signifikant weniger TF als ohne Kokultur.

## 5. Diskussion

Die bakterielle Endokarditis tritt als schwerwiegende Erkrankung besonders bei Patienten nach Herzklappenersatz auf und kann zur Zerstörung der Herzklappe führen (Moreillon and Que 2004). Die Verwendung von biokompatiblen Matrices ist ein interessanter Ansatz um Herzklappen mittels Tissue-Engineering herzustellen (Sodian et al. 2000; Steinhoff et al. 2000; Mol and Hoerstrup 2004). Die ideale Herzklappenprothese vereint folgende Eigenschaften: Optimale hämodynamische Verhältnisse nach Implantation, niedriges Risiko für Thromboembolien, Infektion, Degeneration und die Möglichkeit, mit dem Organismus zu wachsen (Jordan et al. 2012). Fibrin- und Kollagenmatrices fungieren als biologische, dreidimensionale Matrix, die eine Besiedlung mit lebenden Zellen ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen viabel bleiben und nach Proliferation ihren Phänotyp behalten.

In dieser Arbeit untersuchten wir die Bedeutung der Matrix, die im Rahmen von Tissue-Engineering von Herzklappen verwendet wird. Wir evaluierten den Einfluss von Fibrin- und Kollagen auf die Aktivierung proinflammatorischer und prokoagulanter Pathways an intakten Endothelzellen, welche eine initiale Rolle bei der Entstehung der infektiösen Endokarditis spielen (Beekhuizen et al. 1997; Veltrop et al. 1999; Veltrop et al. 2001; Veltrop and Beekhuizen 2002).

Die drei in dieser Arbeit verwendeten Bakterienarten, *S. aureus*, *S. sanguis* und *S. epidermidis* sind bekannte pathogene Keime, die eine infektiöse Endokarditis auslösen können. Das komplexe Zusammenspiel zwischen Bakterium, Endothelzelle und aktivierten Leukozyten im Rahmen der bakteriellen Endokarditis ist auch zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig aufgedeckt. Man geht derzeit davon aus, dass zuerst Bakterien an das noch intakte Endothel anhaften und dieses invadieren. Abhängig von der Pathogenität der Bakterien kommt es direkt zum zytotoxischen Endothelschaden oder zur Endothelzellaktivierung mit Leukozytenadhäsion, Produktion von entzündlichen Mediatoren und bei *S. aureus* zur Tissue Faktor Expression des Endothels (Veltrop et al. 1999; Veltrop and Beekhuizen 2002; Moreillon and Que 2004). Durch den Kontakt von Monozyten mit dem infizierten Endothel werden Zytokine freigesetzt und die Tissue Faktor (TF) Aktivität getriggert, was die Gerinnungskaskade mit Fibrinproduktion in Gang setzt (Veltrop et al. 2001).

Wir konnten Ergebnisse aus vorausgegangenen Experimenten bestätigen, worin gezeigt werden konnte, dass die zelluläre Interaktion insbesondere mit *S. aureus*, aber auch mit *S. sanguis* und *S. epidermidis* ausreicht, um verschiedene

proinflammatorische und prokoagulante Antworten der Endothelzellen auszulösen (Veltrop et al. 1999; Veltrop et al. 2000; Veltrop et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass es nach Infektion von ECs mit *S. aureus* zur Expression von ICAM-1 und VCAM-1 sowie zur Aktivierung der endothelialen Zytokinproduktion (IL-8, MCP-1) kommt. Des Weiteren zeigten Vorarbeiten, dass die Gerinnung über TF aktiviert und nach Adhäsion von Monozyten potenziert wird (Veltrop and Beekhuizen 2002).

Unsere Untersuchung bestätigte die bakterielle Infektion und endotheliale Aktivierung von ECs, die in der Zellkultur auf Polysterenplatten von Veltrop et. al. bereits untersucht wurden (Beekhuizen et al. 1997; Veltrop et al. 1999).

Darüber hinaus stellt diese Arbeit interessante Ergebnisse für die endotheliale Aktivierung von den auf Fibrin - und Kollagengel kultivierten Zellen heraus.

Verglich man die Infektionsrate mit *S. aureus* der Matrixkonditionen Fibringel und Kollagengel mit den Ergebnissen auf Polysteren, so zeigten sich 3-4fach höhere Infektionswerte auf den Gelmatrices. Auch für *S. sanguis* und *S. epidermidis* fanden sich leicht erhöhte Infektionsraten auf den Gelmatrices. Ein Unterschied zwischen den beiden Gelmatrices selbst, also zwischen Fibringel und Kollagengel, lies sich nicht belegen. Die Ergebnisse der Infektionsversuche zeigten somit eindeutig, dass die Infektionskapazität von Bakterien an ECs auf den beiden Gelmatrices höher war als an ECs auf der Polysterenmatrix (Heying et al. 2012). Dieses führte zu der Vermutung, dass die Gelmatrices zusätzliche Faktoren für eine optimale Adhäsion beitrugen und zu einer Veränderung der endothelialen Eigenschaften durch Interaktion von Matrix und Endothelzelle führten.

Man weiß aus vorangegangenen Arbeiten, dass insbesondere *S. aureus* Oberflächenmoleküle besitzt, die an Kollagen und Fibrin binden können (Holderbaum et al. 1986; Gillaspay et al. 1998; Peacock et al. 1999; Rivera et al. 2007).

Unsere Infektionsergebnisse auf der Matrix selbst ohne vorherige EC Besiedelung zeigten, dass besonders *S. aureus* an Fibringel ( $p < 0,01$  vs. Polysteren) und Kollagengel ( $p < 0,01$  vs. Polysteren) bindet. Daher stellte sich die Frage, ob die Ergebnisse dadurch erklärt werden können, dass die Bakterien nicht nur an den Endothelzellen adhärten, sondern auch an der Matrix selbst.

Um dies auszuschließen, wurde die Dichte der Endothelzelllayer mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass der Monolayer auf allen Matrices konfluent und intakt war. Mikroskopisch zeigten sich die Bakterien weit über den gesamten Monolayer verteilt, es gab keine vermehrte Bakterienanhäufung am Rand des

Layers. Damit war ausgeschlossen, dass die erhöhte Infektionsrate auf Grund von Adhäsion der Bakterien an die Matrix selbst zu erklären war. Eine grundsätzlich höhere Infektionskapazität von Bakterien an Endothel, das auf den Gelmatrices kultiviert ist, konnte somit gezeigt werden (Heying et al. 2012).

Betrachtete man die Ergebnisanalyse der verschiedenen Bakterien untereinander auf den Gelmatrices, so blieb die Fähigkeit zur Adhäsion der Bakterien auf den Gelmatrices in Relation gleich: *S. aureus* hat eine höhere (Adams et al. 2006) „Infektionskompetenz“ als *S. sanguis* und *S. epidermidis*. Dies konnte ebenfalls in den Zellkulturversuchen auf Polysteren gezeigt werden. So lässt sich sagen, dass die Matrix keinen Einfluss hierauf hatte. *S. aureus* war vergleichsweise so kompetent wie der Stimulus IL-1.

Auch im Rahmen des Tissue Engineering ist die Besiedelung der verwendeten Matrix mit einem intakten Monolayer von großer Bedeutung. Diese Hypothese stellten Stachelek et. al. bereits 2006 auf. Hier wurde an einer Polyurethanmatrix gearbeitet, die optimale Bedingungen für die Ausbildung eines intakten Endothelzellmonolayers schafft. Mit Cholesterol modifiziertes Polyurethan wurde gegen Unbehandeltes verglichen und die *in vitro* mit Schaf-Endothelzellen besiedelte Matrix in den Organismus implantiert. (Stachelek et al. 2006).

Flanagan und Sachweh implantierten Schafen in einem Tierversuch autologe Pulmonalklappen auf Fibrinbasis nach vorheriger Besiedelung mit autologen Endothelzellen. Hier wurden nach drei Monaten *in vivo* die Klappen explantiert und deren Struktur untersucht. Die Endothelzellmonolayer wurden mittels Elektronenmikroskopie überprüft und die Zelldichte durch Anfärben des von-Willebrand-Faktors verifiziert (Flanagan et al. 2009). Diese Untersuchungsmöglichkeiten zur Verifizierung eines intakten Monolayers könnten zukünftig weiterhin von Bedeutung sein.

In den weiteren Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Matrices auf die inflammatorische Aktivierung der Endothelzellen nach bakterieller Stimulation analysiert.

Aus den *in-vitro* Versuchsbedingungen auf Polysteren ist bekannt, dass nach Infektion von ECs, insbesondere mit *S. aureus*, die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 exprimiert werden sowie die endotheliale Zytokinproduktion (IL-8, MCP-1) aktiviert wird (Vriesema et al. 2000; Heying et al. 2012). Die Analyse der vorliegenden Daten zeigte, dass trotz einer höheren Infektionsrate der *S. aureus* infizierten ECs auf den Gelmatrices die Expression

der Adhäsionsmoleküle in allen Konditionen vergleichbar aktiviert war. Es fand sich keine zur Infektionsrate proportionale endotheliale Aktivierung.

Unsere Ergebnisse der auf Polysteren kultivierten ECs bestätigten Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten (Veltrop et al. 1999). Bereits Veltrop et. al. konnten zeigen, dass eine ausreichende bakterielle Stimulation zur Aktivierung der ECs führte und diese nicht konzentrationsabhängig von der Anzahl der adhärierenden Bakterien war. Wenn ein entsprechender Trigger erreicht war, kam es zur inflammatorischen Reaktion, die nicht mit einer vorangegangenen Infektion zunahm (Beekhuizen et al. 1997; Veltrop et al. 1999). Weiter konnten wir zeigen, dass die Gelmatrices keinen Einfluss auf die Höhe der Expression der Adhäsionsmoleküle hatten (Heying et al. 2012). Es zeigte sich eindeutig, dass die Infektion mit *S. aureus* ein potenter Aktivator der Expression der Oberflächenmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 war. Eine vergleichbare endotheliale Aktivierung zeigten die ECs, die mit IL-1 stimuliert wurden. Die Infektion mit *S. sanguis* oder *S. epidermidis* führte zu einer geringeren endothelialen Aktivierung. Interessant war jedoch die Tatsache, dass bei der proinflammatorischen Aktivierung die Matrix, auf der die Endothelzellen angesiedelt waren, keine Rolle zu spielen schien. Es gab keinen signifikanten Unterschied der beiden Gelmatrices und Polysteren untereinander (Heying et al. 2012).

Die bakterielle Infektion mit den verwendeten Bakterien führte zu einer erhöhten Produktion der endothelialen Zytokine IL-8 und MCP-1. Bei der Auswertung der Zytokinanalyse im Zellüberstand fiel auf, dass ECs auf Kollagengel und in geringeren Maße auf Fibringel tendenziell sowohl weniger MCP-1 als auch weniger IL-8 sezernierten als auf Polysteren, dies trotz der erhöhten Infektionsrate auf den Gelmatrices. Somit schien das Kollagengel und in geringerem Masse das Fibringel einen scheinbar dämpfenden Effekt auf die Zytokinproduktion zu haben. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Produktion von MCP-1 vermittelt durch vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu einer beschleunigten Expression von Tissue Faktor (TF) in Anwesenheit von Monozyten führte (Sakamoto et al. 2007). Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Interaktion zwischen Bakterium und Endothelzelle nach Infektion mit *S. aureus*, aber auch mit *S. sanguis* und *S. epidermidis*, ein ausschlaggebender Faktor für die Zunahme der prokoagulanten Aktivität der infizierten Zelle war. Dies galt vor allem für die Konditionen, in denen Monozyten anwesend waren, Konditionen, die nach *S. aureus*-Infektion zur erhöhten Monozyten-Adhäsion und erhöhter MCP-1 Produktion führten.

Interessante Ergebnisse fanden sich bezüglich der Monozytenadhäsion nach Infektion mit den drei Bakterienstämmen bezüglich der Gelmatrices.

Die Analyse unserer Daten der Monozytenadhäsion ergab Folgendes: Die Adhäsion der Monozyten an die ECs war nach Stimulation mit IL-1 und nach Infektion mit *S. aureus* auf allem Matrices deutlich gesteigert. Interessant war, dass die Monozytenadhäsion auf Fibringel oder Kollagengel signifikant höher war als auf Polysteren, sowohl nach Stimulation mit IL-1 als auch nach Infektion mit *S. aureus* oder nach Infektion mit *S. sanguis*. Die Monozytenadhäsion zeigte also eine Abhängigkeit von der Matrix, auf der die Endothelzellen kultiviert wurden. Hieraus konnte geschlossen werden, dass nicht die gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine und erhöhte Expression der Oberflächenmoleküle zur vermehrten Adhäsion der Monozyten führte, sondern vielmehr die erhöhte Anzahl adhärenter Bakterien an den auf Fibrin – und Kollagengel kultivierten Endothelzellen. Es kam hier zur direkten Interaktion von Bakterien und Monozyten.

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren die Aktivierung der TF-abhängigen Gerinnung, in An- oder Abwesenheit von Monozyten, auf den verschiedenen Gelmatrices evaluiert.

Die Adhäsion und Kumulation von Monozyten auf von *S. aureus* infizierten Endothelzellen spielt eine wichtige Rolle für die Inangangsetzung und Aufrechterhaltung der Tissue Faktor – abhängigen Gerinnung, wie auch bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte (Veltrop et al. 2000; Veltrop et al. 2001; Veltrop and Beekhuizen 2002). Die hier vorliegenden Ergebnisse konnten dies bestätigen.

Unsere Ergebnisse und vorrausgegangene Studien zeigten, dass *S. aureus* auf Grund seiner Virulenz in der Lage war, die TF-abhängige Gerinnung der Endothelzellen auf Polysteren zu aktivieren, welche durch die Adhäsion von Monozyten potenziert wurde (Timmerman et al. 1993; Soderquist et al. 1998).

Die Messung der TF-abhängigen Produktion von FXa in Abwesenheit der Monozyten zeigte einen mäßigen Anstieg, wohingegen es in Anwesenheit der Monozten auf Polysteren zu einer ausgeprägten Steigerung der TF-abhängigen Gerinnung kam.

Im Gegensatz dazu war der gerinnungsaktivierende Effekt der adhärenter Monozyten nicht aufzuweisen, wenn die ECs auf den beiden Gelmatrices kultiviert wurden. Dies führte zu der interessanten Folgerung, dass die Gelmatrices trotz einer erhöhten Anzahl adhärenter Monozyten die TF-abhängige Produktion von

FXa herunter regulierten. Matrix-induzierte Veränderungen des endothelialen Phänotypes und der Monozyteninteraktion schienen den Einfluss der Monozyten auf die Gerinnungsaktivierung zu reduzieren, selbst bei signifikant erhöhter Anzahl an anwesenden Monozyten (Heying et al. 2012). Der Effekt eines Matrix-Remodellings ist vermutlich relevant für die Interaktion von ECs, Monozyten und ihrer Substrate als Antwort auf einen infektiösen Stimulus, wie aus Vorarbeiten bekannt ist (Dreger et al. 2006). Angesichts der wichtigen Rolle von MCP-1 bezüglich der TF Produktion und dem gezeigten Trend einer geringeren endothelialen MCP-1-Produktion auf den Gelmatrices, war zu vermuten, dass niedrigere Spiegel von MCP-1 zu einer reduzierten Gerinnungsaktivierung durch die Monozyten führten. Matrix-getriggerte Veränderungen des endothelialen und monozytärem Zytokinprofil können einen Einfluss auf die Zell-Zell-Interaktion als auch einen Einfluss auf die Aktivierung negativer Feed-Back Mechanismen haben (Heying et al. 2012). Bezugnehmend auf frühere Studien kann hier angenommen werden, dass die Monozyten in ihrer Fähigkeit, die Gerinnung zu aktivieren, herunterreguliert sind. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass der direkte Zellkontakt zwischen Endothelzellen und Monozyten grundlegend ist für die Erhöhung der TF-abhängigen Gerinnung (Veltrop et al. 2001). Untersuchungen mit dreidimensionalen Matrices zeigten ebenfalls auf, dass direkter Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen Endothelzellen und Monozyten zu proinflammatorischer und prokoagulanter Aktivierung notwendig ist (Hakkert et al. 1990; Hakkert et al. 1990). Eine andere Ursache für das Ergebnis, warum es trotz Zellkontakt zwischen einem intakten Endothelzelllayer (wir überprüften mikroskopisch die Lückenlosigkeit der Monolayer) und Monozyten (Adhäsionsversuch zeigte eine erhöhte Menge adhärenter Monozyten auf Fibrinigel oder Kollagengel als Matrix) keine Erhöhung der TF-abhängigen Gerinnung zu verzeichnen war, konnte in der Aktivierung inhibitorischer Pathways liegen. In früheren Versuchen wurde gezeigt, dass auf Fibronectin kultivierte Monozyten sowohl eine gesteigerte Menge an TF als auch Tissue Faktor Pathway Inhibitor (TFPI) produzierten, der zur Herunterregulation der TF-abhängigen Gerinnung führte. Es zeigte sich, dass die Monozyten so die Fähigkeit besitzen, die TF-abhängige Gerinnung zu inhibieren (Bajaj et al. 2007). Des Weiteren scheint das anti-inflammatorische Interleukin II-10 in der Regulation der TF-abhängigen Gerinnung eine Rolle zu spielen. Dies konnte in Versuchen mit Monozyten auf einer mit *Streptococcus sanguis* infizierten Fibrinmatrix gezeigt werden (Veltrop et al. 2001). Interleukin-10 gehört zu der Gruppe der Zytokine mit anti-inflammatorischer Wirkung. Die Bildung von IL-10 übernehmen insbesondere Monozyten. IL-10 spielt eine Rolle in der Regulation des Immunsystems und wirkt

hemmend auf die Entzündungsreaktion des Organismus (Grütz 2005). Im Detail wurde die Herunter-Regulation der TF-Aktivität durch Protein-C-vermittelte IL-10-Produktion sowie die Produktion von IL-4 beschrieben (Paysant et al. 2005; Tolti et al. 2008).

Welche Mechanismen dazu führen, dass Monozyten einen TF-regulierenden Phänotypen ausbilden, sind aktuell nicht bekannt. Bisherige Studien zu genetischen Untersuchungen von Monozyten und deren Zellproteinen ergaben Hinweise, dass die Matrix, auf der die Monozyten kultiviert werden, einen Einfluss auf den Zell-Phänotyp hatte und so inflammatorische Prozesse direkt beeinflusste (Chung and Kao 2009; Zuckerman et al. 2009).

Weiterhin von Bedeutung ist neben der zu Grunde liegenden Matrix auch die extrazelluläre Matrix, die von den Endothelzellen selbst gebildet wird (Barth et al. 2009; Iop et al. 2009).

Ob die zugrunde liegende Matrix indirekt einen negativen Einfluss auf die Bildung von TF durch Monozyten hat, spielt für die Verwendung von Fibrin- oder Kollagen-Gele im Rahmen des Tissue Engineering eine bedeutsame Rolle. Erste Ergebnisse molekular-genetischer Untersuchungen von auf verschiedenen Matrices kultivierten Monozyten unterstützen die These, dass die Matrix einen Einfluss auf den Phänotyp des Monozyten hat (Chung and Kao 2009; Zuckerman et al. 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen das Konzept, dass in der Phase der Klappenkolonisation von Bakterien, wenn Monozyten gerinnungsaktivierende Prozesse stimulieren und es zur Ablagerung von Fibrin kommt, ein direkter Zell-zu-Zellkontakt für die Monozyten-Rekrutierung verantwortlich ist. Das Auslösen regulatorischer Prozesse durch die zugrunde liegende Matrix scheint die Bildung von Thrombin zu beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die Bedeutung einer Fibrin- und Kollagenmatrix für die Ausprägung einer bakteriellen Infektion sowie die daraus folgende endotheliale Aktivierung. Trotz erhöhter Monozyten-Adhäsion an ECs fand sich keine Monozyten-vermittelte Gerinnungsaktivierung der ECs auf diesen Gelmatrices. Die zugrundeliegende Fibrin- und Kollagenmatrix scheint darum ein relevanter Angriffspunkt, um ein optimales Herzklappengerüst im Rahmen des Tissue Engineering herzustellen. Da die Bildung von Herzklappenvegetationen die Morbidität und Mortalität der bakteriellen Endokarditis bestimmt, wäre eine Herzklappe mit einem negativen Einfluss auf die Bildung von Thromben von großem Fortschritt. Für die Herzklappe der Zukunft

kann die Auswahl der Matrix und Konditionierung der Matrix daher ein wichtiger prognostischer Faktor in der Behandlung von Klappenvitien sein.

Andere Arbeitsgruppen dokumentierten weitere Vorteile eines Herzklappengerüsts, das auf Basis von Kollagen und Fibrin konstruiert wird.

Fibrin und Kollagen wurden als biologische, dreidimensionale Matrices beschrieben, deren Struktur und Aufbau die Kultivierung von Endothelzellen sowie deren Proliferation *in vitro* erlauben (Jockenhoevel et al. 2001; Dreger et al. 2006; Taylor et al. 2006; Flanagan et al. 2007; Flanagan et al. 2009). Von großer Bedeutung scheint in diesem Zusammenhang die Möglichkeit der Regeneration der Herzklappe zu sein, wobei die extrazelluläre Matrix eine herausragende Rolle spielt (Jordan et al. 2012). Da die Verwendung von dezellularisierten, xenogenen Herzklappen zu Problemen im Rahmen der Immunabwehr führen kann, was eine frühe Kalzifikation des xenogenen Transplantates begünstigt ist die Herstellung einer Matrix aus körpereigenem Material oder bioresorbierbaren Polymeren als Alternative zum xenogenen Transplantat von großer Bedeutung.

Flanagan et al. veröffentlichten 2009 Ergebnisse einer *in-vivo*-Studie, bei der die Struktur und Beständigkeit von implantierten Herzklappen auf Fibringelbasis untersucht wurden (Flanagan et al. 2009). Hierzu wurden im Tierversuch Schafen Herzklappen auf Fibringelbasis in die Pulmonalarterie implantiert, die zuvor mit autologen Endothelzellen besiedelt wurden. Nach drei Monaten *in vivo* wurden die Klappentransplantate explantiert, um den Zustand der Klappen zu beurteilen. Hierbei zeigte sich, dass die Struktur der Klappen intakt blieb und das ursprüngliche Fibringerüst völlig durch körpereigene Proteinmatrix ersetzt wurde. Bereits 2001 gab es zudem Versuche, die Fibringelmatrix aus autologem Fibrin herzustellen (Jockenhoevel et al. 2001), um so letztlich ein vollständig autolog hergestelltes Transplantat zu erhalten.

Kollagen als Hauptbestandteil kardiovaskulärer Gewebe wurde als Matrix vielfältig untersucht (Taylor et al. 2006). Obwohl Kollagenablagerung eine Rolle in der Kalzifizierung kardialer Gewebe spielt, ist dies ein vielversprechender Ansatz. Tedder et al untersuchten 2009 Kollagen als Matrix und zeigten auf, dass stabilisiertes (moderately cross-linked collagen) Kollagen nicht zur Kalzifizierung der Gewebe führt (Tedder et al. 2009). Auch das Remodelling der Kollagenmatrix mit proteolytischen Enzymen scheint einen günstigen Effekt zu haben. In Anwesenheit proteolytischer Enzyme können die auf der Matrix angesiedelten interstitiellen Zellen Umbauvorgänge auslösen und so die Matrix in körpereigenes Material umwandeln (Dreger et al. 2006). Somit ist die Verwendung einer Fibrin- oder Kollagen-basierten Matrix aus technischer Sicht für die Konstruktion einer

Herzklappe geeignet. Unsere Ergebnisse zeigten auch einen protektiven Einfluss auf die Gerinnungsaktivierung im Rahmen eines *in-vitro* Modells der Endokarditis. Um diese Untersuchungen näher an die *in-vivo*-Situation zu bringen, sind zukünftige Experimente unter Einfluss von *Shear-Stress* in *Flow*-Kammern geplant. Hierbei kann die Auswirkung von Scherkräften auf die Interaktion der Matrix mit ECs und Monozyten untersucht werden. Erste Untersuchungsansätze wurden bereits von Jockenhoevel und Zund et. al. gemacht, wobei humane Myofibroblasten in statischen und dynamischen Bedingungen kultiviert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von extrazellulären Matrixproteinen unter dynamischer Kultur erhöht war (Jockenhoevel et al. 2002; Aleksieva et al. 2012). Aleksieva und Hollweck et. al. verglichen die statische Kultivierung von humanen Endothelzellen auf einer Polyurethanmatrix mit der dynamischen Kultivierung unter geringen *Flow*-Bedingungen im Bioreaktor. Es konnte gezeigt werden, dass unter *Flow*-Bedingungen die Zell-zu-Zell-Bindung der Endothelzellen stärker war (Aleksieva et al. 2012). Licht- und Elektronenmikroskopisch zeigte sich eine Anordnung der kultivierten Zellen in *Flow*-Richtung. In den weiteren Versuchen dieser Arbeit ergab sich eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie erhöhte Produktion von Kollagen IV, VE-Cadherin und Fibronectin bei den ECs in dynamischer Kultur im Gegensatz zu denen in statischer Kultur. Die Auswirkung von Scherkräften ist daher vielfältig und ein potentieller Trigger in der Pathogenese der Endokarditis (Chiu et al. 2003; Chiu et al. 2004).

Die Herausforderung des Tissue Engineering ist, eine Matrix herzustellen, die vorübergehend eine Trägersubstanz für die auf ihr kultivierten Zellen darstellt, nach Transfer *in vivo* abgebaut und durch extrazelluläre Matrix ersetzt werden kann (Sacks et al. 2009; Syedain et al. 2012). Auch Weber et al. postulierten die Möglichkeit, im Rahmen des Tissue Engineering mittels Bioreaktoren gewebetypische Zellen auf der Matrix zu kultivieren, die nach Einbringen *in vivo* durch Monozyteninfiltration und Chemotaxis des Empfängerorganismus umgebaut werden. (Weber et al. 2011). Die so unter *in-vivo*-Bedingungen entstehenden Zell-zu-Zell-Verbindungen sind vermutlich widerstandsfähiger gegen Scherkräfte und daher gegebenenfalls resistenter. Dies könnte das Risiko einer IE potenziell verringern. Zukünftige Untersuchungen sollten insbesondere ein Augenmerk auf die dynamische Kultivierung sowie die Bedeutung der Mikrostruktur der Trägermatrices legen (Argento et al. 2012).

Zusammenfassend geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen tieferen Einblick in die Interaktionen zwischen Endothelzellen, Monozyten und Bakterien im Rahmen der Frühphase der bakteriellen Endokarditis. Die Verwendung der Matrix scheint relevant für den Ablauf der einzelnen inflammatorischen Reaktionen zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass auf Fibrinogen und Kollagen eine erhöhte Bakterienadhäsion an die Endothelzellen stattgefunden hat, was folglich zur inflammatorischen Reaktion führte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass trotz einer vermehrten Adhäsion von Monozyten an die infizierten Endothelzellen auf Fibrinogen oder Kollagen eine herunterregulierte, verminderte Aktivierung der Gerinnungskaskade via Tissue Faktor zu verzeichnen war (Heying et al. 2012). Dementsprechend beherbergen Matrices wie Fibrin und Kollagen einen potentiell positiven Effekt auf die Bildung von Thromben und Klappenvegetationen. Diese Erkenntnisse liefern interessante Ansätze für die Konstruktion der optimalen Herzklappenbasis im Rahmen des Tissue Engineering.

## 6. Schlussfolgerung

Die Anforderungen an die „optimale Herzklappe“ sind vielfältig. Neben sofortiger und uneingeschränkter Verfügbarkeit ist die Biokompatibilität von großer Bedeutung. Biologische Herzklappen haben eine eingeschränkte Lebensdauer. Das Risiko einer immunologischen Reaktion kann auch durch die chemische Präparation der biologischen Klappe nicht vollständig ausgeschlossen werden. Mechanischer Klappenersatz führt zur lebenslang notwendigen Antikoagulation mit Blutungsrisiken.

Das Prinzip des Tissue Engineering schafft die Möglichkeit, eine Herzklappe zu konstruieren, die entweder vollständig aus körpereigenem Material besteht oder Trägersubstanzen mit diesem besiedelt. Hierbei ist das Ziel, eine Herzklappe zu schaffen, die zu keiner immunologischen Reaktion führt und zudem im lebenden Organismus Zellerneuerung und damit potenzielles Wachstum möglich macht. Hierbei sind verschiedene Ansätze zur Entwicklung der Trägermatrix Gegenstand aktueller Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss der Matrix auf die Entzündungsreaktion der auf ihr kultivierten Endothelzellen. Obwohl es im Rahmen der Infektion zu einer vermehrten Adhäsion der Bakterien an die auf Fibrin – und Kollagengel kultivierten Endothelzellen und zu einer vermehrten Monozytenadhäsion kam, zeigte sich eine verminderte Ausprägung der Tissue Faktor abhängigen Gerinnung. Die Entwicklung einer thrombogenen Auflagerung (Vegetation) an die infizierte Herzklappe und das damit verbundene Risiko der Thromboembolie ist eine der gefährlichsten Komplikationen der infektiösen Endokarditis. Wir konnten *in vitro* zeigen, dass die Matrix einen potenziell protektiven Einfluss auf die Gerinnungsaktivierung hatte. Die hier zugrunde liegenden, potentiellen Mechanismen sind Gegenstand weiterer Untersuchungen. Ebenso können zukünftige Experimente unter Flow-Bedingungen zusätzliche Informationen, die der in-vivo-Situation näher sind, erschließen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sowie weiterführende Untersuchungen können Ansatzpunkte identifizieren, die die Konstruktion einer Herzklappe aus vollständig biokompatiblen Material mit protektiven Eigenschaften, so als ein reduziertes Infektionsrisiko, ermöglichen. Dies ist in der Therapie der kongenitalen und erworbenen Herzklappenerkrankung von großem Wert.

## 7. Literatur – und Quellenverzeichnis

- Adams, J. E., M. E. Zobitz, J. S. Reach, Jr., K. N. An and S. P. Steinmann (2006). "Rotator cuff repair using an acellular dermal matrix graft: an in vivo study in a canine model." Arthroscopy **22**(7): 700-709.
- Aleksieva, G., T. Hollweck, N. Thierfelder, U. Haas, F. Koenig, C. Fano, et al. (2012). "Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering." Biomed Eng Online **11**(1): 92.
- Angrist, A. A. and M. Oka (1963). "Pathogenesis of bacterial endocarditis." Jama **183**: 249-252.
- Argento, G., M. Simonet, C. W. Oomens and F. P. Baaijens (2012). "Multi-scale mechanical characterization of scaffolds for heart valve tissue engineering." J Biomech **45**(16): 2893-2898.
- Baddour, L. M., W. R. Wilson, A. S. Bayer, V. G. Fowler, Jr., A. F. Bolger, M. E. Levison, et al. (2005). "Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America." Circulation **111**(23): e394-434.
- Bajaj, M. S., M. Ghosh and S. P. Bajaj (2007). "Fibronectin-adherent monocytes express tissue factor and tissue factor pathway inhibitor whereas endotoxin-stimulated monocytes primarily express tissue factor: physiologic and pathologic implications." J Thromb Haemost **5**(7): 1493-1499.
- Balguid, A., M. P. Rubbens, A. Mol, R. A. Bank, A. J. Bogers, J. P. van Kats, et al. (2007). "The role of collagen cross-links in biomechanical behavior of human aortic heart valve leaflets-relevance for tissue engineering." Tissue Eng **13**(7): 1501-1511.
- Bancsi, M. J., M. H. Veltrop, R. M. Bertina and J. Thompson (1996). "Influence of monocytes and antibiotic treatment on tissue factor activity of endocardial vegetations in rabbits infected with *Streptococcus sanguis*." Infect Immun **64**(2): 448-451.
- Bancsi, M. J., M. H. Veltrop, R. M. Bertina and J. Thompson (1996). "Role of phagocytosis in activation of the coagulation system in *Streptococcus sanguis* endocarditis." Infect Immun **64**(12): 5166-5170.
- Bancsi, M. J., M. H. Veltrop, R. M. Bertina and J. Thompson (1998). "Role of monocytes and bacteria in *Staphylococcus epidermidis* endocarditis." Infect Immun **66**(2): 448-450.
- Barth, M., H. Schumacher, C. Kuhn, P. Akhyari, A. Lichtenberg and W. W. Franke (2009). "Cordial connections: molecular ensembles and structures of adhering junctions connecting interstitial cells of cardiac valves in situ and in cell culture." Cell Tissue Res **337**(1): 63-77.
- Beekhuizen, H., A. J. Corsel-van Tilburg and R. van Furth (1990). "Characterization of monocyte adherence to human macrovascular and microvascular endothelial cells." J Immunol **145**(2): 510-518.
- Beekhuizen, H., J. S. van de Gevel, B. Olsson, I. J. van Benten and R. van Furth (1997). "Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes." J Immunol **158**(2): 774-782.
- Böcker, D., Heitz, Moch (2008). Pathologie, 4. vollständig überarbeitete Auflage, Elsevier GmbH, Urban&Fischer Verlag, München.
- Camerer, E., A. B. Kolsto and H. Prydz (1996). "Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation." Thromb Res **81**(1): 1-41.
- Chia, J. S., H. T. Lien, P. R. Hsueh, P. M. Chen, A. Sun and J. Y. Chen (2002). "Induction of cytokines by glucosyltransferases of *streptococcus mutans*." Clin Diagn Lab Immunol **9**(4): 892-897.

- Chiu, J. J., L. J. Chen, P. L. Lee, C. I. Lee, L. W. Lo, S. Usami, et al. (2003). "Shear stress inhibits adhesion molecule expression in vascular endothelial cells induced by coculture with smooth muscle cells." *Blood* **101**(7): 2667-2674.
- Chiu, J. J., P. L. Lee, C. N. Chen, C. I. Lee, S. F. Chang, L. J. Chen, et al. (2004). "Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(1): 73-79.
- Chung, A. S. and W. J. Kao (2009). "Fibroblasts regulate monocyte response to ECM-derived matrix: the effects on monocyte adhesion and the production of inflammatory, matrix remodeling, and growth factor proteins." *J Biomed Mater Res A* **89**(4): 841-853.
- Day, M. D., K. Gauvreau, S. Shulman and J. W. Newburger (2009). "Characteristics of children hospitalized with infective endocarditis." *Circulation* **119**(6): 865-870.
- Dohmen, P. M. and W. Konertz (2009). "Tissue-engineered heart valve scaffolds." *Ann Thorac Cardiovasc Surg* **15**(6): 362-367.
- Dreger, S. A., P. Thomas, E. Sachlos, A. H. Chester, J. T. Czernuszka, P. M. Taylor, et al. (2006). "Potential for synthesis and degradation of extracellular matrix proteins by valve interstitial cells seeded onto collagen scaffolds." *Tissue Eng* **12**(9): 2533-2540.
- Durack, D. T. (1975). "Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions." *J Pathol* **115**(2): 81-89.
- Durack, D. T., A. S. Lukes and D. K. Bright (1994). "New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service." *Am J Med* **96**(3): 200-209.
- Eichinger, W. B., J. B. Grammer, B. Zhao, J. Bruckner, N. Mendler, R. Lange, et al. (2005). "Transcriptional regulation of alpha5beta1 integrin, fibronectin, VCAM-1, MCSF-1/c-fms, and MCP-1 in atrioventricular valves after valvular surgery and Staphylococcus aureus bacteremia." *Cytokine* **31**(6): 465-472.
- Eilertsen, K. E. and B. Osterud (2005). "The role of blood cells and their microparticles in blood coagulation." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 2): 418-422.
- Filova, E., F. Straka, T. Mirejovsky, J. Masin and L. Bacakova (2009). "Tissue-engineered heart valves." *Physiol Res* **58 Suppl 2**: S141-158.
- Flanagan, T. C., C. Cornelissen, S. Koch, B. Tschoeke, J. S. Sachweh, T. Schmitz-Rode, et al. (2007). "The in vitro development of autologous fibrin-based tissue-engineered heart valves through optimised dynamic conditioning." *Biomaterials* **28**(23): 3388-3397.
- Flanagan, T. C., J. S. Sachweh, J. Frese, H. Schnoring, N. Gronloh, S. Koch, et al. (2009). "In vivo remodeling and structural characterization of fibrin-based tissue-engineered heart valves in the adult sheep model." *Tissue Eng Part A* **15**(10): 2965-2976.
- Gillaspy, A. F., C. Y. Lee, S. Sau, A. L. Cheung and M. S. Smeltzer (1998). "Factors affecting the collagen binding capacity of Staphylococcus aureus." *Infect Immun* **66**(7): 3170-3178.
- Grütz (2005). "New insights into the molecular mechanism of Interleukin-10-mediated immunosuppression." *Journal of Leukocyte Biology* **77**, January 2005: 3-15.
- Hahn, C. L., A. M. Best and J. G. Tew (2007). "Rapid tissue factor induction by oral streptococci and monocyte-IL-1beta." *J Dent Res* **86**(3): 255-259.
- Hakkert, B. C., J. M. Rentenaar, W. G. Van Aken, D. Roos and J. A. Van Mourik (1990). "A three-dimensional model system to study the interactions between human leukocytes and endothelial cells." *Eur J Immunol* **20**(12): 2775-2781.
- Hakkert, B. C., J. M. Rentenaar and J. A. van Mourik (1990). "Monocytes enhance the bidirectional release of type I plasminogen activator inhibitor by endothelial cells." *Blood* **76**(11): 2272-2278.
- Helmholtz-Institut, R. A., Department of Tissue Engineering and Textile Implants. "www.ame.hia.rwth-aachen.de."
- Herold (2013). *Innere Medizin* 2013.
- Heying, R., C. Wolf, H. Beekhuizen, M. L. Moelleken, S. Jockenhoevel, M. F. Hoylaerts, et al. (2012). "Fibrin- and Collagen-Based Matrices Attenuate Inflammatory and Procoagulant

- Responses in Human Endothelial Cell Cultures Exposed to Staphylococcus aureus." Tissue Eng Part A **18**(1-2): 147-156.
- Hill, E. E., P. Herijgers, P. Claus, S. Vanderschueren, M. C. Herregods and W. E. Peetermans (2007). "Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study." Eur Heart J **28**(2): 196-203.
- Hill, E. E., P. Herijgers, P. Claus, S. Vanderschueren, W. E. Peetermans and M. C. Herregods (2008). "Clinical and echocardiographic risk factors for embolism and mortality in infective endocarditis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**(12): 1159-1164.
- Hoen, B. (2006). "Epidemiology and antibiotic treatment of infective endocarditis: an update." Heart **92**(11): 1694-1700.
- Holderbaum, D., G. S. Hall and L. A. Ehrhart (1986). "Collagen binding to Staphylococcus aureus." Infect Immun **54**(2): 359-364.
- Holtmann, B. (2008). BASICS Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Elsevier GmbH, Urban&Fischer Verlag München.
- Iop, L., V. Renier, F. Naso, M. Piccoli, A. Bonetti, A. Gandaglia, et al. (2009). "The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds." Biomaterials **30**(25): 4104-4116.
- Jockenhoevel, S., K. Chalabi, J. S. Sachweh, H. V. Groesdonk, L. Demircan, M. Grossmann, et al. (2001). "Tissue engineering: complete autologous valve conduit--a new moulding technique." Thorac Cardiovasc Surg **49**(5): 287-290.
- Jockenhoevel, S., G. Zund, S. P. Hoerstrup, K. Chalabi, J. S. Sachweh, L. Demircan, et al. (2001). "Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering." Eur J Cardiothorac Surg **19**(4): 424-430.
- Jockenhoevel, S., G. Zund, S. P. Hoerstrup, A. Schnell and M. Turina (2002). "Cardiovascular tissue engineering: a new laminar flow chamber for in vitro improvement of mechanical tissue properties." Asaio J **48**(1): 8-11.
- Jordan, J. E., J. K. Williams, S. J. Lee, D. Raghavan, A. Atala and J. J. Yoo (2012). "Bioengineered self-seeding heart valves." J Thorac Cardiovasc Surg **143**(1): 201-208.
- Lindl, G. (2008). Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lode (2004). "Wichtige Erreger in Klinik und Praxis." Zeitschrift für Chemotherapie **2/2004**: 11.
- Lopes-Bezerra, L. M. and S. G. Filler (2003). "Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases." Braz J Med Biol Res **36**(8): 987-991.
- Loughman, A., J. R. Fitzgerald, M. P. Brennan, J. Higgins, R. Downer, D. Cox, et al. (2005). "Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by Staphylococcus aureus clumping factor A." Mol Microbiol **57**(3): 804-818.
- Lowy, F. D. (1998). "Staphylococcus aureus infections." N Engl J Med **339**(8): 520-532.
- Massey, R. C., M. N. Kantzanou, T. Fowler, N. P. Day, K. Schofield, E. R. Wann, et al. (2001). "Fibronectin-binding protein A of Staphylococcus aureus has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells." Cell Microbiol **3**(12): 839-851.
- Mattsson, E., R. Heying, J. S. van de Gevel, T. Hartung and H. Beekhuizen (2008). "Staphylococcal peptidoglycan initiates an inflammatory response and procoagulant activity in human vascular endothelial cells: a comparison with highly purified lipoteichoic acid and TSST-1." FEMS Immunol Med Microbiol **52**(1): 110-117.
- Mattsson, E., L. Verhage, J. Rollof, A. Fleer, J. Verhoef and H. van Dijk (1993). "Peptidoglycan and teichoic acid from Staphylococcus epidermidis stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6." FEMS Immunol Med Microbiol **7**(3): 281-287.
- Mehlin, C., C. M. Headley and S. J. Klebanoff (1999). "An inflammatory polypeptide complex from Staphylococcus epidermidis: isolation and characterization." J Exp Med **189**(6): 907-918.

- Menzies, B. E. (2003). "The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections." *Curr Opin Infect Dis* **16**(3): 225-229.
- Milazzo, A. S., Jr. and J. S. Li (2001). "Bacterial endocarditis in infants and children." *Pediatr Infect Dis J* **20**(8): 799-801.
- Mol, A. and S. P. Hoerstrup (2004). "Heart valve tissue engineering -- where do we stand?" *Int J Cardiol* **95 Suppl 1**: S57-58.
- Mol, A., M. C. Rutten, N. J. Driessen, C. V. Bouten, G. Zund, F. P. Baaijens, et al. (2006). "Autologous human tissue-engineered heart valves: prospects for systemic application." *Circulation* **114**(1 Suppl): I152-158.
- Monk, A. B., S. Boundy, V. H. Chu, J. C. Bettinger, J. R. Robles, V. G. Fowler, Jr., et al. (2008). "Analysis of the genotype and virulence of Staphylococcus epidermidis isolates from patients with infective endocarditis." *Infect Immun* **76**(11): 5127-5132.
- Moreillon, P. and Y. A. Que (2004). "Infective endocarditis." *Lancet* **363**(9403): 139-149.
- Moreillon, P., Y. A. Que and A. S. Bayer (2002). "Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis." *Infect Dis Clin North Am* **16**(2): 297-318.
- Murdoch, D. R., G. R. Corey, B. Hoen, J. M. Miro, V. G. Fowler, Jr., A. S. Bayer, et al. (2009). "Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study." *Arch Intern Med* **169**(5): 463-473.
- Mylonakis, E. and S. B. Calderwood (2001). "Infective endocarditis in adults." *N Engl J Med* **345**(18): 1318-1330.
- Nilsdotter-Augustinsson, A., C. Claesson, P. E. Lindgren, H. Lundqvist-Gustafsson and L. Ohman (2005). "Adherence of Staphylococcus epidermidis to extracellular matrix proteins and effects of fibrinogen-bound bacteria on oxidase activity and apoptosis in neutrophils." *Apmis* **113**(5): 361-373.
- Patti, J. M. (2005). "Vaccines and immunotherapy for staphylococcal infections." *Int J Artif Organs* **28**(11): 1157-1162.
- Paysant, J., C. Soria, P. Cornillet-Lefebvre, P. Nguyen, B. Lenormand, Z. Mishal, et al. (2005). "Long-term incubation with IL-4 and IL-10 oppositely modifies procoagulant activity of monocytes and modulates the surface expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor." *Br J Haematol* **131**(3): 356-365.
- Peacock, S. J., N. P. Day, M. G. Thomas, A. R. Berendt and T. J. Foster (2000). "Clinical isolates of Staphylococcus aureus exhibit diversity in fnb genes and adhesion to human fibronectin." *J Infect* **41**(1): 23-31.
- Peacock, S. J., T. J. Foster, B. J. Cameron and A. R. Berendt (1999). "Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of Staphylococcus aureus to resting human endothelial cells." *Microbiology* **145 ( Pt 12)**: 3477-3486.
- Piette, A. and G. Verschraegen (2009). "Role of coagulase-negative staphylococci in human disease." *Vet Microbiol* **134**(1-2): 45-54.
- Que, Y. A., P. Francois, J. A. Haefliger, J. M. Entenza, P. Vaudaux and P. Moreillon (2001). "Reassessing the role of Staphylococcus aureus clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in Lactococcus lactis." *Infect Immun* **69**(10): 6296-6302.
- Rivera, J., G. Vannakambadi, M. Hook and P. Speziale (2007). "Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria." *Thromb Haemost* **98**(3): 503-511.
- Robinson, P. S., S. L. Johnson, M. C. Evans, V. H. Barocas and R. T. Tranquillo (2008). "Functional tissue-engineered valves from cell-remodeled fibrin with commissural alignment of cell-produced collagen." *Tissue Eng Part A* **14**(1): 83-95.
- Sacks, M. S., F. J. Schoen and J. E. Mayer (2009). "Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering." *Annu Rev Biomed Eng* **11**: 289-313.
- Sakamoto, T., T. Ishibashi and Y. Maruyama (2007). "Role of Ca(2+)influx in tissue factor expression in monocyte adhesion to endothelial cells." *J Atheroscler Thromb* **14**(3): 109-115.

- Schaefermeier, P. K., D. Szymanski, F. Weiss, P. Fu, T. Lueth, C. Schmitz, et al. (2009). "Design and fabrication of three-dimensional scaffolds for tissue engineering of human heart valves." Eur Surg Res **42**(1): 49-53.
- Scheld, W. M., J. A. Valone and M. A. Sande (1978). "Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin." J Clin Invest **61**(5): 1394-1404.
- Schwarz-Linek, U., M. Hook and J. R. Potts (2006). "Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci." Microbes Infect **8**(8): 2291-2298.
- Shanmugam, G., K. MacArthur and J. Pollock (2005). "Pediatric mitral valve replacement: incremental risk factors impacting survival and reintervention." J Heart Valve Dis **14**(2): 158-165.
- Shi, Y., R. Iyer, A. Soundararajan, D. Dobkin and I. Vesely (2005). "Collagen-based Tissue Engineering as Applied to Heart Valves." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **5**: 4912-4915.
- Sinha, B., P. Francois, Y. A. Que, M. Hussain, C. Heilmann, P. Moreillon, et al. (2000). "Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells." Infect Immun **68**(12): 6871-6878.
- Soderquist, B., J. Kallman, H. Holmberg, T. Vikerfors and E. Kihlstrom (1998). "Secretion of IL-6, IL-8 and G-CSF by human endothelial cells in vitro in response to Staphylococcus aureus and staphylococcal exotoxins." Apmis **106**(12): 1157-1164.
- Sodian, R., S. P. Hoerstrup, J. S. Sperling, S. Daebritz, D. P. Martin, A. M. Moran, et al. (2000). "Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves." Circulation **102**(19 Suppl 3): III22-29.
- Stachelek, S. J., I. Alferiev, J. M. Connolly, M. Sacks, R. P. Hebbel, R. Bianco, et al. (2006). "Cholesterol-modified polyurethane valve cusps demonstrate blood outgrowth endothelial cell adhesion post-seeding in vitro and in vivo." Ann Thorac Surg **81**(1): 47-55.
- Steinhoff, G., U. Stock, N. Karim, H. Mertsching, A. Timke, R. R. Meliss, et al. (2000). "Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue." Circulation **102**(19 Suppl 3): III50-55.
- Stinson, M. W., S. Alder and S. Kumar (2003). "Invasion and killing of human endothelial cells by viridans group streptococci." Infect Immun **71**(5): 2365-2372.
- Stock, J. H. and D. J. Sahn (2000). "Endocarditis in the Pediatric Population." Curr Treat Options Cardiovasc Med **2**(6): 481-488.
- Stock, U. A. and K. Schenke-Layland (2006). "Performance of decellularized xenogeneic tissue in heart valve replacement." Biomaterials **27**(1): 1-2.
- Syedain, Z. H., A. R. Bradee, S. Kren, D. A. Taylor and R. T. Tranquillo (2012). "Decellularized Tissue-Engineered Heart Valve Leaflets with Recellularization Potential." Tissue Eng Part A.
- Taylor, P. M., S. P. Allen, S. A. Dreger and M. H. Yacoub (2002). "Human cardiac valve interstitial cells in collagen sponge: a biological three-dimensional matrix for tissue engineering." J Heart Valve Dis **11**(3): 298-306; discussion 306-297.
- Taylor, P. M., E. Sachlos, S. A. Dreger, A. H. Chester, J. T. Czernuszka and M. H. Yacoub (2006). "Interaction of human valve interstitial cells with collagen matrices manufactured using rapid prototyping." Biomaterials **27**(13): 2733-2737.
- Tedder, M. E., J. Liao, B. Weed, C. Stabler, H. Zhang, A. Simionescu, et al. (2009). "Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering." Tissue Eng Part A **15**(6): 1257-1268.
- Teebken, O. E., C. Puschmann, T. Aper, A. Haverich and H. Mertsching (2003). "Tissue-engineered bioprosthetic venous valve: a long-term study in sheep." Eur J Vasc Endovasc Surg **25**(4): 305-312.
- Tilley, R. and N. Mackman (2006). "Tissue factor in hemostasis and thrombosis." Semin Thromb Hemost **32**(1): 5-10.

- Timmerman, C. P., E. Mattsson, L. Martinez-Martinez, L. De Graaf, J. A. Van Strijp, H. A. Verbrugh, et al. (1993). "Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans." *Infect Immun* **61**(10): 4167-4172.
- Tissieres, P., A. Gervais, M. Beghetti and E. T. Jaeggi (2003). "Value and limitations of the von Reyn, Duke, and modified Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis in children." *Pediatrics* **112**(6 Pt 1): e467.
- Totl, L. J., S. Beaudin and P. C. Liaw (2008). "Activated protein C up-regulates IL-10 and inhibits tissue factor in blood monocytes." *J Immunol* **181**(3): 2165-2173.
- Veltrop, M. H., M. J. Bancsi, R. M. Bertina and J. Thompson (2000). "Role of monocytes in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis." *Infect Immun* **68**(8): 4818-4821.
- Veltrop, M. H. and H. Beekhuizen (2002). "Monocytes maintain tissue factor activity after cytolysis of bacteria-infected endothelial cells in an in vitro model of bacterial endocarditis." *J Infect Dis* **186**(8): 1145-1154.
- Veltrop, M. H., H. Beekhuizen and J. Thompson (1999). "Bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells." *Infect Immun* **67**(11): 6130-6138.
- Veltrop, M. H., J. A. Langermans, J. Thompson and M. J. Bancsi (2001). "Interleukin-10 regulates the tissue factor activity of monocytes in an in vitro model of bacterial endocarditis." *Infect Immun* **69**(5): 3197-3202.
- Veltrop, M. H., J. Thompson and H. Beekhuizen (2001). "Monocytes augment bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor activity in bacterium-infected human vascular endothelial cells." *Infect Immun* **69**(5): 2797-2807.
- Vernier, A., M. Diab, M. Soell, G. Haan-Archipoff, A. Beretz, D. Wachsmann, et al. (1996). "Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors." *Infect Immun* **64**(8): 3016-3022.
- Vernier, A., B. Gourieux, J. P. Klein and D. Wachsmann (1997). "Protein I/II from oral viridans streptococci modulates expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1, and promotes transendothelial migration of neutrophils in vitro." *Adv Exp Med Biol* **418**: 717-720.
- Vesely, I. (2005). "Heart valve tissue engineering." *Circ Res* **97**(8): 743-755.
- Vriesema, A. J., H. Beekhuizen, M. Hamdi, A. Soufan, A. Lammers, B. Willekens, et al. (2000). "Altered gene expression in *Staphylococcus aureus* upon interaction with human endothelial cells." *Infect Immun* **68**(4): 1765-1772.
- Weber, B., M. Y. Emmert, R. Schoenauer, C. Brokopp, L. Baumgartner and S. P. Hoerstrup (2011). "Tissue engineering on matrix: future of autologous tissue replacement." *Semin Immunopathol* **33**(3): 307-315.
- Yeh, C. Y., J. Y. Chen and J. S. Chia (2006). "Glucosyltransferases of viridans group streptococci modulate interleukin-6 and adhesion molecule expression in endothelial cells and augment monocytic cell adherence." *Infect Immun* **74**(2): 1273-1283.
- Zuckerman, S. T., J. F. Brown and W. J. Kao (2009). "Identification of regulatory Hck and PAI-2 proteins in the monocyte response to PEG-containing matrices." *Biomaterials* **30**(23-24): 3825-3833.

## 8. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Bakterienverteilung Infektiöse Endokarditis

Aus: Hill EE et al., Eur Heart J. 28: 196 – 203 (2007)

Abb. 2: Prinzip der Herzklappenherstellung auf der Basis einer Fibringelmatrix

Aus: Helmholtz-Institut, RWTH Aachen, Department of Tissue Engineering and Textile Implants, [www.ame.hia.rwth-aachen.de](http://www.ame.hia.rwth-aachen.de)

Abb. 3: Zelllayer nach Färbung der Zellkerne mit DAPI

Abb. 4: Mikroskopie des Endothelzelllayers

Abb. 5: Bakterienadhäsion von Ecs, kultiviert auf unterschiedlichen Matrices

Abb. 6: Durchflusszytometrieanalyse der endothelialen Expression von ICAM-1 nach bakterieller Infektion

Abb. 7: Durchflusszytometrieanalyse der endothelialen Expression von VCAM-1 nach bakterieller Infektion

Abb. 8: Endotheliale Produktion von IL-8, IL-6 und MCP-1 nach bakterieller Infektion

Abb. 9: Monozytenadhäsion auf Endothelzellen nach bakterieller Infektion

Abb. 10: Prokoagulante Aktivität - TF-abhängige Bildung von Fxa

Tabelle 1: Zellzahl / Fläche (Mittelwerte der Zellzahlen pro Quadratzentimeter) nach DAPI-Färbung

Tabelle 2: Bakterienadhäsion an den Matrices ohne Endothelzellen

## 9. Lebenslauf

Name

Carolin Pelzer, geb. Wolf

Studium

Oktober 2002- November 2008  
Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Staatsexamen November 2008 (2.0)

## 10. Danksagung

Allen voran geht mein Dank an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst Schroten, für seine professionelle Unterstützung und Geduld.

Für Ihre unermüdliche Unterstützung, ständige Hilfsbereitschaft und unendliche Geduld danke ich meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Ruth Heying. Ohne Deine wirklich sehr gute fachliche und freundschaftliche Begleitung wäre mir Einiges deutlich schwerer gefallen.

Mein weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter des Labors für Infektiologie der Universitäts-Kinderklinik Düsseldorf, im Besonderen Marie-Louise Mölleken, Anette Seibt. Vielen Dank für die vielseitige fachliche und praktische Unterstützung und die vielen guten Ratschläge.

Ein persönlicher und inniger Dank geht an meine Freunde, insbesondere an Dich, Kasia, für Deine Hilfe und Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Familie. Für Eure liebevolle Begleitung in allen Lebenslagen, insbesondere für die Unterstützung in der finalen Phase dieser Arbeit bin ich Euch unendlich dankbar. Papa, ohne Deine Erinnerungen wäre ich niemals fertig geworden. Mama, Isa, Krissi, Ihr habt mich die ganzen Jahre begleitet und hattet jederzeit ein offenes Ohr. Maxi, Danke Dir für Deine liebevolle Motivation, Deine Begleitung und Dein Verständnis.

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

10.11.2014, Carolin Pelzer